UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 835

ESSAI DE DÉTERMINATION DE LA PATHOGÉNIE DES STAPHYLOCOQUES PAR LEURS PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 11 juin 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

BERNARD MOCH
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1964

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 835

ESSAI DE DÉTERMINATION DE LA PATHOGÉNIE DES STAPHYLOCOQUES PAR LEURS PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 11 juin 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

BERNARD MOCH
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1964

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. GAZET DU CHATELIER, *Doyen*, I. ✪
P. DUQUÉNOIS, *Doyen honoraire*, ❋, I. ✪, ✿
J. SCHREIBER, *Assesseur*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	R. SARTORY, O. ❋ I. ✪, O. ✿	Bactériologie
	P. CORDIER, ❋, I. ✪	Pharmacie chimique
	P. DUQUÉNOIS, ❋, I. ✪, ✿	Matière médicale
	P. JAEGER, I. ✪, ✿	Botanique
	G. GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	M. HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	J. SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	P. METAIS	Chimie biologique
	G. LAUSTRIAT	Physique

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ch. LAPP, ❋ I. ✪, J.P. EBEL, ❋ ✿ I. ✪

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	A. LEDOUX, ✿, ✪	Sciences naturelles
	J. MALGRAS	Sciences naturelles
	Ch. F. LAPP	Sciences physico-chimiques
	G. DIRHEIMER	Sciences appliquées

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. E. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	R. SARTORY	Cryptogamie
	P. DUQUENOIS	Hydrologie
	G. GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	J. SCHREIBER	Chimie générale
	P. METAIS	Biochimie pharmaceutique et technique
	G. LAUSTRIAT	Éléments de Mathématiques, Acoustique, Physique Biologique appliquée
	P. LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	J. MALGRAS	Sérologie
	Ch. F. LAPP	Cristallographie
	G. DIRHEIMER	C.E. Supérieures de Chimie Biologique
	G. MEYER	Comptabilité et Fiscalité pharmaceutiques
	G. GREINER	Pathologie de l'oreille et phonétique

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mmes	M. KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
	N. OURISSON	Histoire naturelle
MM.	C MATHIS	Chimie
	A. STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	Ch. ROMOND	Bactériologie
	C. WERMUTH	Chimie
	L. JUNG	Physique
Mlle	D. SCHAELDERLE	Chimie
M.	H. WITTERSHEIM	Physique

SECRÉTAIRE : M. Ch. CLADY

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur P. CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MALGRAS

Maître de Conférences de Sciences Naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A la mémoire de mon Père,

dont la vie d'homme et de scientifique m'a servi de guide et d'exemple, et à qui je dois tout.

A ma chère Mère,

en faible témoignage de mon affection filiale.

A ma chère Epouse,

qui m'a activement secondé dans l'élaboration de ce travail.

A mes chers Enfants,

A mes chers Beaux-parents.

INTRODUCTION

Dans l'ère prébactériologique, la « *pourriture des hôpitaux* » était considérée comme un mal inévitable et inspirait la plus grande crainte. On comprenait sous ce terme les maladies infectieuses dont les malades étaient atteints pendant leur séjour dans les hôpitaux. Dans l'ignorance de l'étiologie et du mécanisme de transmission de ces infections, la lutte contre elles était impossible. On sait aujourd'hui qu'il s'agissait surtout de la *gangrène gazeuse et de septicémies dues aux Coques.*

Par la découverte de la bactériologie et des connaissances sur la genèse des infections, par l'instauration de la désinfection et de la stérilisation, et par l'amélioration des conditions d'hygiène générale, les maladies graves dues à la « *pourriture des hôpitaux* » ont pu être en grande partie vaincues. L. GRÜN (1) affirme qu'aujourd'hui une gangrène gazeuse contractée au cours d'un séjour à l'hôpital mérite d'être publiée, tant elle est devenue rare. Il serait cependant exagéré de dire que les cas d'infections contractées dans les hôpitaux ont complètement disparu; ainsi, il est aussi peu possible d'éviter l'infection de plaies initialement aseptiques que la contagion dans les cliniques infantiles.

Avec la découverte de médicaments hautement antimicrobiens, tels que les *sulfamides* et les *antibiotiques biologiques*, il semblait que l'on devait pouvoir vaincre définitivement les rares infections qu'on notait encore dans les hôpitaux. On croyait en effet que dans la lutte entre les hommes et les bactéries, ces médicaments feraient pencher la balance en faveur des malades. Les premiers succès remportés par cette thérapeutique ont contribué à son utilisation comme médication prophylactique. On s'est cependant très vite rendu compte que différents germes septicémiques, et en particulier les *Staphylocoques*, devenaient résistants à ces substances antibactériennes. Ce fait se manifestait beaucoup moins dans la pratique courante que dans les cliniques, et en particulier dans celles où l'antibiothérapie est largement employée.

Cette flore staphylococcique résistante rencontrée principalement dans les cliniques est devenue le point de départ d'une nouvelle forme de « *pourriture des hôpitaux* » que KIKUTH et GRÜN (2) ont désigné par le terme « d'*hospitalisme staphylococcique* ». Il s'agit d'un processus infectieux très complexe, qui résulte de la forte concentration de *Staphylocoques résistants* dans un milieu relativement limité, du grand nombre de *porteurs de germes* parmi le personnel soignant, de la *prédisposition* marquée des malades par suite de leur état de moindre résistance et surtout de la thérapie antibiotique qui, par son action sur *la flore bactérienne normale* de l'homme, peut faciliter ces infections.

Nous n'avons pas l'intention d'envisager dans le cadre de notre travail l'épidémiologie de *cette forme particulière de l'hospitalisme*, ni son importance clinique et sociale ; il nous intéresse surtout de pouvoir poser des diagnostics différentiels de ces agents pathogènes.

La flore staphylococcique est devenue pour ainsi dire ubiquitaire dans les hôpitaux et les cliniques, puisqu'on la trouve aussi bien dans l'appareil rhino-pharyngé que sur la peau des malades et du personnel, de même que sur les objets de contact, la literie et les poussières des locaux.

L'importance clinique de ces *Staphylocoques* est illustrée le mieux par le fait qu'ils sont devenus la cause la plus fréquente des infections contractées dans les maisons de santé. Environ 5 à 10 % des enfants naissant dans les maternités acquièrent dans les premiers jours une *infection due aux Staphylocoques;* 5 à 15 % des *infections putrides* après intervention chirurgicale sont également dues à ces germes. Ceux-ci prennent une importance de plus en plus grande dans les cas de *pneumonies*, de *broncho-pneumonies* et de *pleurésies*. Toutes ces infections sont très graves par suite du nombre de cas mortels qui peuvent en résulter.

Pour pouvoir contrôler les causes d'épidémies de *staphylococcies hospitalières*, il est nécessaire d'élaborer des techniques permettant une caractérisation spécifique des différentes espèces de *Staphylocoques* appartenant au même genre, à la même souche, si possible. C'est seulement de cette façon que l'on peut suivre la marche de la propagation du germe et lutter utilement contre ces épidémies.

Dans ces dernières années on a pu développer largement les techniques permettant de différencier les souches, et ceci soit par des *méthodes sérologiques*, soit par *lysotypie*. C'est ainsi que l'on a pu établir de nombreux sous-types de l'espèce *Staphylococcus pyogenes*. Ces méthodes sont très longues et minutieuses et réservées à des biologistes spécialisés, de sorte que l'on a recherché des techniques plus simples, permettant une différenciation plus grossière et l'élimination des cultures ne pouvant entrer en ligne de compte dans *ces épidémies staphylococciques des hôpitaux*.

Le but de notre travail est par conséquent d'éprouver un certain nombre de souches de *Staphylocoques* quant à leurs propriétés biochimiques et enzymatiques, qui pourraient permettre de déterminer leur pathogénéité et de sélectionner ainsi des méthodes permettant de caractériser rapidement des souches pathogènes.

Ces recherches nous ont paru d'autant plus justifiées que la mise en évidence du pouvoir pathogène *des Staphylocoques « in vivo »* semble également très aléatoire d'après des études récentes. Ainsi Richou et Lallouette concluent dans leur travail paru en 1963 dans la Revue d'Immunologie (1963, 27, 279) :

« Il ressort de l'ensemble des résultats que nous venons de rapporter que certains Staphylocoques sont capables de déclencher une infection, parfois mortelle, chez l'animal d'expérience auquel on les inocule. Ces Staphylocoques sont considérés comme pathogènes.

Toutefois il ne faut pas perdre de vue que la mise en évidence de leur pouvoir pathogène « in vivo » dépend de divers facteurs : sensibilité de l'animal d'expérience, laquelle varie non seulement avec l'espèce et l'âge, mais avec les individus; mode d'inoculation ; quantité de germes inoculés, cultivés sur gélose, sur bouillon, pendant un temps plus ou moins long, etc...

Dans la détermination du pouvoir pathogène du Staphylocoque « in vivo » jouent donc les interactions du germe et de l'hôte.

Des moyens que nous avons examinés permettent donc au Staphylocoque d'extérioriser, dans une certaine mesure, son pouvoir pathogène envers une espèce animale donnée, soit en augmentant la sensibilité de l'animal aux germes (en le plaçant par exemple en état de moindre résistance), soit en augmentant le pouvoir d'attaque du germe pour l'organisme, les deux phénomènes pouvant, dans certains cas, s'ajouter.

En fait, le pouvoir pathogène d'un Staphylocoque n'apparaît pas comme une propriété intrinsèque du germe. C'est pourquoi, lorsque l'on recherchera « in vivo » si un Staphylocoque est doué de pouvoir pathogène, on pourra seulement dire que, dans les conditions expérimentales utilisées, ce Staphylocoque s'est montré pathogène, par exemple pour le lapin, le cobaye ou la souris, sans pouvoir en inférer les symptômes qu'il engendrerait chez l'homme. »

On se rend ainsi compte de l'importance d'une étude devant élucider la détermination du pouvoir pathogène *des Staphylocoques* par des méthodes éprouvées et facilement réalisables dans le laboratoire d'analyses cliniques.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous tenons à remercier ici Monsieur R. Sartory, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour l'accueil si aimable qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour le grand honneur qu'il nous fait aujourd'hui en présidant le jury de notre thèse.

Nos remerciements vont également à Monsieur P. Cordier, *Professeur de Pharmacie Chimique*, et à Monsieur J. Malgras, *Maître de Conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle ils ont bien voulu s'intéresser à notre travail et accepter de siéger dans ce jury.

Monsieur J. Meyer, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, a droit à notre gratitude toute particulière, Instigateur de ce travail, il nous a soutenu et encouragé au cours de son élaboration, nous aidant dans la mesure du possible à le mener à bien.

Nous voudrions aussi exprimer notre reconnaissance à Monsieur le Docteur R. Richou, *Directeur de l'Office International des Epizooties*, qui a bien voulu nous procurer des souches bactériennes et du matériel bactériologique nécessaire à nos recherches.

PLAN DE TRAVAIL

Le but de notre travail est d'essayer de déterminer la pathogénéité des *Staphylocoques* par leurs propriétés biochimiques et enzymatiques à l'aide de techniques simples et adaptées à la pratique courante du laboratoire. En effet, on sait que la seule méthode admise pour la détermination de la pathogénie « *in vitro* » *est la réaction de coagulase* qui, elle-même, est controversée.

C'est dans cet ordre d'idée que nous élaborons *notre Historique* qui relate dans *le premier chapitre* la classification et l'identification *des Staphylocoques pathogènes par des examens* « *in vivo* » *et* « *in vitro* ».

Dans le Chapitre II, nous donnons les considérations épidémiologiques sur les principales affections staphylococciques, qui, dans ces dernières années, ont pris une importance particulière par l'apparition de maladies désignées sous le terme « d'*hospitalisme staphylococcique* » et qui sont dues principalement à l'antibiothérapie biologique et synthétique massive pratiquée dans les cliniques.

Les chapitres suivants sont réservés à *nos travaux personnels*. *Le Chapitre III* a trait au diagnostic différentiel *des Staphylocoques* et de leur pathogénéité par la réaction de coagulase.

Pour compléter ces recherches nous examinons, *dans le Chapitre IV*, le processus de fibrinolyse, phénomène qui se manifeste déjà dans la réaction de coagulase par la dissolution du coagulum dans les premières 24 heures.

Pour obvier à l'interférence de ces deux phénomènes, nous envisageons *dans le Chapitre V* la réaction de *plasma-agglutination* qui, par sa rapidité d'exécution, permet d'éliminer l'intervention de la fibrinolysine.

Dans le Chapitre VI nous complétons ces investigations par le dosage *des précipitines*, des α et β-*hémolysines*, qui doit nous permettre tout d'abord d'évaluer la toxinogenèse des différentes souches de *Staphylocoques* et de différencier les germes pathogènes pour l'homme, élaborant spécifiquement des α-*hémolysines*, de ceux pathogènes pour l'animal et essentiellement producteurs de β-*hémolysines*.

Finalement, nous contrôlons, *dans le Chapitre* VII, la valeur de diagnostic différentiel des *enzymes lipolytiques* pour la sélection de diverses espèces de *Staphylocoques*.

Des Conclusions générales terminent notre exposé, suivies *d'un index bibliographique* qui prouve l'intérêt soulevé par ces problèmes parmi les microbiologistes et les cliniciens.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

CLASSIFICATION ET IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES

Les considérations synoptiques énoncées dans notre *Introduction* ont amené à la conception de l'existence de *Staphylocoques pathogènes* nettement différenciés. On pensait tout d'abord pouvoir se baser sur des propriétés biologiques. telles que la *chromogenèse*, *l'activité hémolytique* et la *pathogénéité pour les animaux*. Cette conception s'est cependant révélée comme non valable et on s'est en particulier vite rendu compte que le pouvoir pathogène sur les animaux était inutilisable pour déterminer la pathogénéité chez l'homme. Des recherches ultérieures ont également démontré que les *propriétés biochimiques* ne peuvent pas être employées non plus. *puisque les processus pathologiques sont nettement différents d'une souche à l'autre. même si les propriétés biochimiques sont identiques.* Il est donc aussi impossible d'utiliser les propriétés pathologiques pour la classification taxonomique des Staphylocoques.

Le terme de *Staphylocoque pathogène* est cependant entré dans l'usage courant de la médecine. D'après la systématique établie par BERGEY (1957) les Staphylocoques pathogènes sont rangés dans la famille des *Micrococcacées Pribram*, qui englobe les genres aérobies et facultativement anaérobies. Il s'agit des :

1) *Micrococcus*,
2) *Staphylococcus*,
3) *Gaffkya*,
4) *Sarcina*.

D'autre part, y figurent les genres anaérobies stricts :

5) *Methanococcus*,
6) *Peptococcus*.

Les espèces pathogènes pour l'homme se trouvent uniquement dans les genres 2) et 6). Les anaérobies stricts dont le principal représentant est l'espèce *Streptococcus aerogenes Schottmuller* n'ont qu'un rôle insignifiant et leurs processus pathologiques ne cadrent pas avec l'aspect habituel des *Staphylocoques pathologiques*. Ainsi, les Staphylocoques pathogènes typiques se trouvent presque exclusivement dans le genre 2). Celui-ci a été divisé au moyen de la *réaction de coagulase* et de *fermentation du mannitol* en deux espèces : *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus épidermidis*. D'après Breed (1957) les espèces de ce dernier groupe doivent être considérées comme parasites plutôt que comme pathogènes ; *par conséquent Staphylococcus aureus seul doit être considéré comme pathogène.*

A côté de la classification de Bergey, on a encore recours à celle de Shaw, Stitt et Cowan (3). Ces auteurs ont rangé dans une systématique tous les *Coques catalase-positifs non groupés en chaîne*. Après en avoir séparé le *groupe* α, synonyme du genre *Aerococcus*, et les *Coques strictement anaérobies*, il reste un groupe homogène qui englobe les espèces *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Gaffkya et Rhodococcus*.

Pour différencier ce groupe *Staphylococcus-Micrococcus*, les auteurs ont recours aux caractères suivants :

1) *Réaction de coagulase positive :* sous-groupe I,
2) *Fermentation acide à partir du glucose :* tous les sous-groupes à l'exception du sous-groupe V.
3) *Production d'acétyl-méthyl-carbinol positive :* sous-groupes I et II.
4) *Production de pigment rouge positive :* sous-groupe IV.

Pour désigner ces différents sous-groupes, les auteurs ont proposé les noms suivants :

Sous-groupe I	*Staphylococcus aureus Rosenbach*
Sous-groupe II	*Staphylococcus saprophyticus Fairbrother*
Sous-groupe III	*Staphylococcus lactis n. sp.*
Sous-groupe IV	*Staphylococcus roseus Tavel*
Sous-groupe V	*Staphylococcus afermentans ex-Castellani.*

Étant donné que *les Staphylocoques pathogènes* sont actuellement caractérisés par la plupart des auteurs grâce à la réaction de coagulase et la dégradation du mannitol, on ne doit plus prendre en considération la différenciation par le pigment. Tous les Staphylocoques coagulase-positifs et dégradant en anaérobiose le mannitol doivent être rangés dans le genre *Staphylococcus aureus*, et ceci indépendamment de la présence ou non de pigment jaune doré. De cette façon les espèces *Staphylococcus citreus et albus* sont tombées en désuétude. Le terme de *Staphylococcus pyogenes* doit être évité, puisqu'il ne cadre plus avec la taxonomie internationale. Les Staphylocoques pathogènes forment ainsi un genre

indépendant de la famille VII de Bergey et l'on ne doit plus employer les termes de *Micrococcus pyogenes, var. aureus et var. albus.*

Dans les deux systèmes taxonomiques, la *réaction de coagulase* est donc déterminante pour différencier l'espèce Staphylococcus aureus, respectivement le sous-groupe I : *Staphylococcus aureus Rosenbach.* Cette conception est admise aujourd'hui par la plupart des microbiologistes. Ce fait ne signifie cependant pas que tous les Staphylocoques coagulase-positifs doivent avoir forcément une activité pathogène au moment de la détermination. Il semble que l'espèce *Staphylococcus aureus* n'est pas homogène et le même fait est valable pour *les Staphylocoques coagulase-négatifs.* Shaw et ses collaborateurs ont ainsi différencié le sous-groupe II renfermant les *Staphylocoques coagulase-négatifs* comme pendant du sous-groupe I. Smith, Beals et leurs collaborateurs (4) font remarquer qu'il existe à côté de variantes coagulase-positives blanches et de Staphylococcus épidermidis apathogène, des espèces blanches non-coagulantes, mais dégradant le mannitol. Elles sont avirulentes pour le lapin et la souris, mais provoquent chez l'homme une maladie ressemblant à une septicémie lente.

Kienitz et Preuner (5) ont trouvé des souches staphylococciques dans des infections humaines, isolées par exemple de l'appareil uro-génital ou des méninges, et qui sont *coagulase-négatives.* Ces souches sont pathogènes pour l'embryon de poulet, phénomène qui cadre mieux avec le processus clinique.

Jackson et ses collaborateurs (6) qui ont examiné des Staphylocoques provenant des voies respiratoires supérieures, croient que le *test de l'α-hémolysine* est plus spécifique de la pathogénéité que la réaction de coagulase.

D'après la conception actuelle, cette dernière est considérée comme spécifique pour classer les Staphylocoques dans le sous-groupe I. Des espèces *coagulase-négatives* nécessitent par contre un examen approfondi au moyen des autres critères.

On voit ainsi que le problème de la caractérisation *des Staphylocoques pathogènes* par les réactions biochimiques n'est pas résolu et qu'une contribution à ces études se justifie pleinement.

Évaluation du pouvoir pathogène des Staphylocoques :

Les quatre épreuves essentielles auxquelles on a actuellement recours pour évaluer le pouvoir pathogène des Staphylocoques sont les suivantes :

— Épreuve positive par *inoculation intradermique* au lapin.
— Épreuve de l'*action coagulante* de la bactérie sur le plasma sanguin.
— Épreuve du *pouvoir fermentatif* sur le mannitol.
— Réaction au *Violet cristallisé.*

La détermination du pouvoir pathogène sur l'animal pourrait apparaître comme une méthode de choix. On devrait pouvoir évaluer « *in*

vivo » sur le lapin soit le pouvoir pathogène général du Staphylocoque, soit son pouvoir pathogène local.

La méthode pour l'évacuation du *pouvoir pathogène général* consiste à injecter par voie intraveineuse, à des lapins dépourvus d'immunité antistaphylococcique naturelle, des quantités variables (2 — 1 — 0,5 — 0,25 — 0,10 ml) d'une suspension préparée à partir d'une culture de 24 heures sur gélose (10 ml de soluté physiologique pour un tube de gélose inclinée).

Pour la recherche des *antitoxines staphylococciques* d'origine naturelle, on emploie les méthodes mises au point par Ramon et Richou (7). Le Staphylocoque est pathogène ou non, suivant que les animaux succombent ou survivent.

Cette méthode a l'inconvénient de nécessiter un trop grand nombre d'animaux.

Quant à l'évaluation du *pouvoir pathogène local*, Kourilsky et Mercier (8) ont élaboré une méthode permettant d'évaluer facilement, avec un nombre restreint de lapins, le pouvoir pathogène local d'un Staphylocoque. Elle consiste à injecter sous la peau du lapin, dont le sérum ne renferme pas d'antitoxine staphylococcique naturelle, 1 ml d'une dilution en soluté physiologique, allant de 1/10^{e} à 1/2 000^{e} d'une suspension préparée à partir d'une culture de 24 heures sur gélose. On emploie 10 ml de soluté physiologique par tube de gélose. Les auteurs recommandent d'employer de préférence des lapins blancs, dont la peau est plus sensible.

On peut ainsi pratiquer 12 injections par lapin, c'est-à-dire six de chaque côté. On note la dilution qui donne une réaction inflammatoire nette le 4^{e} jour, moment où la réaction est à son apogée. Cette méthode permet de comparer le pouvoir pathogène local de différents Staphylocoques.

Comme nous l'avons déjà dit, *ces épreuves sur l'animal ne sont cependant pas spécifiques pour déceler la pathogénéité des espèces vis-à-vis de l'homme.*

En ce qui concerne le *pouvoir coagulant sur le plasma sanguin*, nous reviendrons ultérieurement sur ce problème, étant donné que cette réaction est actuellement considérée comme la plus concluante pour la détermination de la pathogénéité humaine d'une souche de Staphylocoque.

De nombreuses études ont été effectuées pour examiner *le pouvoir enzymatique du mannitol*, en rapport avec la virulence d'un Staphylocoque. Citons à ce sujet que les auteurs suivants : Gordon (9), Winslow (10), Dudgeon (11) parmi de nombreux autres, ont effectué des études quant à la fermentation des substances ternaires par les Staphylocoques. De ces recherches il s'est dégagé la notion que les différentes oses, souvent si utiles pour la différenciation des bactéries, ne peuvent pas être employées pour les Staphylocoques, vu la grande variabilité enzymatique des différentes souches de ces germes. *La fermentation du mannitol*

seule présente une valeur différentielle certaine. La plupart des auteurs ont pu confirmer qu'environ 95 % de tous les Staphylocoques coagulase-positifs dégradent le mannitol. Cependant, d'après Shaw, Stitt et Cowan, beaucoup de Staphylocoques des autres sous-groupes possèdent également cette possibilité. Ainsi, ces auteurs ont trouvé dans le sous-groupe II : 75%, dans le sous-groupe III : 70%, dans le sous-groupe IV : 25% d'espèces mannitolytiques, alors que le sous-groupe V en est complètement exempt.

Pakula, Rabzynska et Zaleska (12) ont trouvé des espèces mannitolytiques chez 96 % de Staphylocoques coagulase-positifs et chez 34,7 % de Staphylocoques coagulase-négatifs. D'après Bergey, seule la réaction effectuée en anaérobiose est valable pour la taxonomie. *La concentration du milieu en chlorure de sodium* a également une certaine importance dans cette réaction différentielle. Nous aurons l'occasion d'y revenir dans nos travaux personnels. Mentionnons cependant que Richou indique la technique suivante pour contrôler le pouvoir enzymatique des Staphylocoques sur le mannitol :

La souche en question est ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon à 2 % de peptone et 5 % de chlorure de sodium, additionné de 1 à 2 % de mannitol. Après 48 heures de culture à l'étuve à 37°, on mesure le pH de la culture à l'aide de l'indicateur universel ou d'autres méthodes ionométriques. Avec les souches pathogènes, le pH descend souvent à une valeur de 4,0 et même de 3,0, alors qu'avec les souches non-pathogènes, il se maintient aux environs de pH = 7,0. Des tubes témoins sans mannitol doivent également être ensemencés et éprouvés avec le même indicateur. Nous pensons que la méthode peut être simplifiée en introduisant un indicateur de pH directement dans le bouillon avant l'ensemencement. Cependant, Richou insiste sur l'avantage de la première méthode.

On peut encore ensemencer le Staphylocoque en étude sur un milieu solide, tel le milieu gélosé de Chapman, renfermant 5,5 % de chlorure de sodium, 1 % de mannite et comme indicateur de pH le rouge de phénol. Le virage de l'indicateur rend compte de la fermentation du mannitol et indique dont la pathogénéité éventuelle du germe.

Kourilsky et Mercier font remarquer qu'il est nécessaire de noter la fermentation du mannitol dans les 48 premières heures de culture, car passé ce délai, les Staphylocoques, même non pathogènes à coagulase négative, peuvent dégrader le polyalcool.

Pour Christie et Keagh (13) *les souches fermentant le mannitol en moins de 48 heures seraient presque toujours coagulase-positives.* Cependant Richou (14) fait remarquer à ce sujet que les multiples essais comparatifs qu'il a effectués avec ses collaborateurs ont montré que si toutes les souches coagulant le plasma oxalaté fermentent également le mannitol, certaines souches qui ne coagulent pas le plasma oxalaté peuvent néanmoins fermenter le mannitol en moins de 48 heures. *Cet auteur conclut que la fermentation du mannitol permet une appréciation*

assez exacte du pouvoir pathogène, si l'on prend les précautions nécessaires, alors que Meyer (15) *est d'avis que l'emploi de ce test est superflu dans la pratique courante.*

La réaction au Violet cristallisé a été proposée en 1935 par Chapman et Berens (16) pour différencier les Staphylocoques pathogènes des souches saprophytes. Ce test figure parmi les réactions biochimiques de typage établies par Chapman, connues sous l'abréviation de « P.H.C. V.B.M.-test » (pigment-hémolyse-coagulase-violet cristallisé-bromothymol bleu-mannitol-test). Déjà en 1934, Epstein (17) a remarqué que les Staphylocoques peuvent se comporter différemment vis-à-vis du violet cristallisé, puisque certaines souches sont très sensibles à ce colorant et poussent mal ou pas du tout en sa présence, alors que pour d'autres souches la croissance est satisfaisante avec formation de pigment spécifique. Klastrup (18) a pu obtenir à l'aide de ce test une classification provisoire *des Staphylocoques aureus* en cinq sous-groupes. Tulinius et Rosendal (19), en employant la méthode modifiée d'après Kristensen, ont pu diviser les *Staphylocoques aureus* en 7 types.

Kretschmar et Witt (20) ont fait en 1960 la proposition de reclasser le test au violet cristallisé dans le schéma de typage biochimique. Meyer en se basant sur ses expériences de lysotypie, a pu montrer que le test au violet cristallisé peut servir pour diviser les Staphylocoques coagulase-positifs en deux grands groupes se différenciant par leurs propriétés biochimiques. Le premier, contenant la plupart des espèces, a trait aux Staphylocoques pathogènes pour l'homme, tandis que le second concerne surtout les souches virulentes pour les animaux.

Richou a abandonné depuis longtemps cette méthode, car elle est à son avis entachée d'un pourcentage important d'erreurs.

Nous avons ainsi donné un aperçu général sur les quatre épreuves essentielles de détermination de la pathogénéité des Staphylocoques. Nous n'insistons pas sur les autres propriétés enzymatiques toxigènes des Staphylocoques, telles que les *hémolysines, la fibrinolysine, la gélatinolysine, les lipases, l'hyaluronidase, la caséinase et la lécithinase*, en renvoyant à ce sujet au travail de Kesselring (21). Nous aurons d'ailleurs l'occasion, dans nos travaux personnels, de revenir sur certaines d'entre elles.

CHAPITRE II

CONSIDÉRATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR LES PRINCIPALES AFFECTIONS STAPHYLOCOCCIQUES

On peut tout d'abord se demander si chaque souche de *Staphylococcus aureus* est capable d'engendrer, dans certaines conditions, l'une quelconque des affections imputées habituellement aux Staphylocoques. A ce titre, nous savons que la plupart des lysotypes staphylococciques ont été isolés à partir de nombreux processus connus en clinique. Cependant les épidémies présentent d'habitude une certaine uniformité clinique, qui pourrait être due à des facteurs individuels ou exogènes. Certaines souches de *Staphylocoques* ont par contre un pouvoir pathogène spécial indépendant des facteurs exogènes. Ainsi, nous trouvons la souche du *lysotype* 71 presque exclusivement comme agent infectieux des affections cutanées superficielles et particulièrement de *l'impétigo contagieux.*

Les dermatoses :

De nombreux auteurs ont voulu démontrer que l'agent des staphylodermies était un Staphylocoque, hôte normal d'un sujet porteur de germes, végétant principalement dans l'appareil rhino-pharingé. Ainsi Williams et ses collaborateurs (22) ont décelé *chez des porteurs rhinopharyngés* 7,1 % d'infections de plaies dues à ce germe, alors que l'on n'en trouve que 2 % chez les sujets non-porteurs. *Ils admettent donc que le nez constitue chez l'homme sain la source principale d'infections primaires staphylococciques*, et doit être rendu particulièrement responsable des auto-infections. Colbeck (23) a observé que dans les cas chirurgicaux on rencontre 16 fois plus de porteurs de germes staphylococciques de l'appareil rhino-pharyngé que de sujets exempts de pollution rhino-pharyngée. Roodyn (24) a isolé la souche nasale idiogène de 77 % de personnes atteintes d'orgelet. La possibilité d'une auto-infection est surtout manifeste lors des rechutes. D'après Valentine et Hall-Smith (25) on trouve d'habitude dans les furonculoses récidivantes le type de Staphylocoque homologue nasal. Dans ces cas, comme pour les orgelets, on décèle même après plusieurs mois d'intervalle le même lysotype nasal. Par contre, Roodyn n'a constaté que chez 37 % de cas de furoncle solitaire une concordance entre le type infectieux et celui siégeant dans l'appareil rhino-pharyngé, et dans 17 % des cas, il a pu caractériser des types nettement différents. Ruys et ses collaborateurs (26) ont

confirmé ces observations chez des mineurs atteints de furonculose. D'après Edmunds et ses collaborateurs (27), 51 % des souches de Staphylocoques isolées de processus inflammatoires sont différentes des souches prélevées au niveau d'autres régions du corps de ces malades. Dans les cas *d'infections post-opératoires*, Browne et ses collaborateurs (28) n'ont jamais trouvé comme agent un Staphylocoque identique aux souches décelées chez ces malades avant l'intervention chirurgicale.

Dans les *pyodermies*, la virulence du *Staphylococcus aureus* n'intervient pas seule; l'âge, la profession du malade, sa prédisposition à l'infection, l'exposition à la contamination par son travail et son entourage jouent certainement un rôle important. Le pemphigus aigu des nouveau-nés, se manifestant dans les premières semaines de la vie, est caractérisé par son aspect clinique et il est d'habitude dû à *la même souche de Staphylocoque doré*. La contagion se fait souvent dans les maternités et les pouponnières par la même personne et ce sont particulièrement les sages-femmes qui sont les porteurs de germes. Dans un grand nombre d'épidémies, on a isolé le *Staphylococcus aureus type* 71, qui est aussi l'agent le plus fréquent des impétigos. Cette souche se rencontre aussi en permanence chez les jeunes écoliers, alors que la chaîne de contamination est généralement courte dans les hôpitaux. La contagion se fait par contact direct, et généralement de peau à peau.

Pour Barrow (29) le germe nasal ne semble pas en cause dans ces cas *d'impétigo*. Il a isolé chez 46 % seulement de ces malades la même souche au niveau du foyer d'impétigo et dans le nez; 63 % des infections étaient dues au type 71 et 17 % à des souches très apparentées à ce type. Parmi 164 cas *d'affections staphylococciques diverses*, les examens ont permis de ne déceler qu'un cas dû au type 71 et 9 cas dus à des types voisins. Dans la *furonculose*, au contraire, Valentine et Hale-smith ont déterminé 68 à 80 % de concordance entre la flore staphylococcique focale et nasale, et pour le *sycosis*, le pourcentage atteignait même 91 %.

Quant à la *surinfection de plaies*, Devenish et Miles (30) citent des cas où la contagion provenait d'un chirurgien, chez lequel on trouvait constamment des Staphylocoques sur la peau des mains, sans qu'il soit porteur de germes rhino-pharyngés. Comme ces auteurs pensaient que les infections pouvaient provenir de la défectuosité des gants de caoutchouc, Browne et ses collaborateurs ont systématiquement effectué des prélèvements sur des gants chirurgicaux, mais n'ont jamais pu en isoler ou cultiver des souches pathogènes. La contamination en salle d'opération s'effectue presque toujours *par des souches étrangères à cette pièce*, mais pouvant être isolées sur le personnel d'entretien et les infirmiers. La plupart des surinfections chirurgicales provient de souches de Staphylocoques dorés résistant aux antibiotiques à large spectre d'action.

Lund (31) a constaté que les surinfections post-opératoires sont les plus fréquentes dans les *cliniques de chirurgie thoracique*, mais l'âge et l'état général du patient, ainsi que la gravité de l'intervention joueraient un grand rôle. Dans ces cas, la contagion a son origine principalement

dans l'appareil respiratoire et les souches staphylococciques sont bronchogènes.

Un fait intéressant a été signalé par FOSTER et HUTT (32) qui ont constaté que les Staphylocoques se reproduisaient très rapidement lorsque les plaies opératoires infectées restent soigneusement couvertes par la literie; ils en concluent que l'humidité favorise ces surinfections, alors que l'emploi de poudres ou d'autres médicaments déshydratants ne paraît avoir aucun rapport avec la contamination par les Staphylocoques.

Infections localisées à certains organes :

Il faut citer ici principalement les *mastites*, les *parotidites*, les *pneumonies*, les *entérites* et les infections staphylococciques de *l'appareil urogénital.*

Pour les *mastites*, la contamination de la mère s'effectue en général par le nourrisson même. Les nouveau-nés éliminent dans les premières semaines de vie une grande quantité de Staphylocoques. Au cours d'une épidémie de mastite, WYSHAM (33) n'a pu observer d'abcès aux seins que chez les mères qui allaitaient directement les bébés porteurs de germes massifs et de type staphylococcique identique à celui de la mère. MEYER et RISCHE (34) ont constaté dans une maternité que 87,3 % de toutes les mastites étaient dues à un même type de Staphylocoque, qui ne put être isolé que rarement dans la clinique, sur les objets de contact et le personnel soignant. La contagion par les infirmières, les sages-femmes, la literie, les pommades ainsi que l'auto-infection par les lochies semblent donc tout-à-fait exceptionnelles. Une autre preuve de l'origine des mastites est la fréquence des pyodermies du nourrisson chaque fois qu'une épidémie de mastite apparaît dans une maternité. Pour plus de détails, nous renvoyons au travail de W. MEYER.

Les épidémies et endémies de *parotidites infectieuses* ne sont pas rares dans les services chirurgicaux, sans que l'on ait pu déceler un rapport direct avec l'intervention chirurgicale ou la flore staphylococcique commensale des malades.

Les *pneumonies à Staphylocoques* font partie des affections hospitalières. La voie de contamination peut être canaliculaire ou septicémique. Le plus souvent, la pneumonie staphylococcique apparaît à la suite d'une autre maladie anergisante, telle que la grippe, les oreillons, etc... D'après WILLIAMS et RIPPON (35) ces pneumonies sont en général dues à des souches staphylococciques lysotype I. Cependant, d'autre souches peuvent également engendrer des pneumonies, surtout chez des malades ayant déjà été traités aux antibiotiques à large spectre d'action.

Les *infections staphylococciques de l'appareil uro-génital* sont rarement le fait d'une auto-infection, mais plutôt dues à une surinfection exogène par les sondes, cystoscopes, etc.

L'épidémiologie des *entérites staphylococciques* n'est pas encore très connue. Leur apparition pourrait être due à certains facteurs individuels,

tels que la répression de la flore normale de l'intestin par les antibiotiques à large spectre d'action, ou à des interventions chirurgicales, à condition qu'il y ait présence de souches bactériennes à action entérotoxique. L'auto-infection comme source des germes est discutable ; Cook, Elliott et leurs collaborateurs (36) la considèrent comme très importante, car sur 19 cas ils en ont trouvé 6 chez lesquels ils ont pu isoler le type correspondant dans l'appareil rhino-pharyngé, avant l'apparition de l'entérite. On observe assez souvent des entérites consécutives à un traitement antibiotique : ainsi les 8 cas rapportés par Webster (37) sont apparus dans six services différents d'une même clinique.

La surinfection par des souches résistantes spécifiques d'un hôpital est considérée comme plus importante par Senn et Lundsgaard-hansen (38), qui rapportent que seuls 2 de leurs cas étaient dus à une infection endogène, alors que 8 autres infections provenaient de germes résistants résidant dans la clinique.

En conclusion, on peut dire que l'apparition de telles affections nécessite pour chaque cas une étude approfondie du milieu ambiant.

Affections staphylococciques généralisées :

La plupart des auteurs, parmi lesquels nous citons Hassall et Rountree (39) sont d'avis que ces affections sont conditionnées par une prédisposition due à un affaiblissement de l'individu. Les traumatismes semblent jouer un rôle tout particulier, et il a été indubitablement prouvé que la généralisation de ces affections est plus fréquente chez les enfants et les vieillards.

D'après les observations de Walker et Hamburger (40) dans des cas d'endocardites post-opératoires, le temps de latence entre l'infection et l'éruption de la maladie est souvent relativement long.

Affections dues aux toxines staphylococciques :

Dans ce groupe, il y a lieu de réserver une attention particulière aux *aliments avariés*, qui ne déclenchent pas une affection infectieuse, mais un véritable empoisonnement, comparable au botulisme.

Les germes responsables peuvent avoir été détruits par l'ébullition, de sorte qu'il est impossible de les déceler chez les patients. C'est pourquoi l'examen sérologique est important.

Ces intoxications alimentaires sont dues à des souches de Staphylocoques entérotoxigènes, dont les techniques de détermination routinière ne sont pas encore au point actuellement.

La croissance de ces germes et la formation des toxines sont favorisées par certains produits alimentaires. D'après Takaes et Juhasz (41) *les Staphylocoques entérotoxiques* manifestent une nette préférence pour les substrats contenant de *l'albumine*, alors que Stolmakova (42) est d'avis

que l'*amidon* joue également un rôle déterminant. Le plus souvent ce sont la viande, le lait et la patisserie qui sont à l'origine de ces intoxications, ainsi que certains aliments à l'état de semi-conserve. D'après CATHCART (43) la concentration ionique est de la plus haute importance, puisqu'un milieu acide entrave la croissance.

Un autre facteur déterminant de la multiplication des germes entérotoxiques est le *rapport température/temps*. Ainsi, STOMALKOVA a noté une formation satisfaisante d'entérotoxines dans une bouillie de semoule infectée, et ceci en l'espace de 4 heures à la température de 35° à 37°, alors qu'à 19°-20° cette genèse demandait 8 heures et qu'entre 5°-6°, elle n'apparaissait qu'au bout de 18 jours. Cependant, le facteur temps est variable suivant qu'il s'agisse de purée de pomme de terre, de bouillie de semoule ou de lait.

De même, le nombre de germes présents joue également un grand rôle dans l'apparition de ces toxi-infections alimentaires. MOSSEL (44) admet comme minimale une concentration de 10^4 à 10^5 par gramme, même s'il s'agit d'une souche entérotoxigène. D'après ALLISON (45) les toxi-infections alimentaires sont régies par trois critères :

1) *Anamnèse et image pathologique typiques*;
2) *Concentration suffisante de germes* dans le produit alimentaire incriminé;
3) *Détermination du même type de germes* dans l'aliment et dans les excrétions du malade.

Pour retrouver la source de la contamination, il faut rechercher le même type de germes chez le producteur ou le fabricant du produit alimentaire incriminé; mais l'existence de petites plaies purulentes ne suffit pas. Il est connu que chez les personnes travaillant dans les produits alimentaires, les plaies ont facilement tendance à suppurer, ceci sans doute parce que les aliments représentent un milieu favorable au développement de *Staphylococcus aureus*. A ce sujet, il est intéressant de rapporter une observation de ANDERSON et STONE. Au cours d'une intoxication alimentaire par du lait en poudre dans une école, on découvrit sur un doigt du cuisinier de la cantine scolaire un panaris contenant le type de *Staphylocoque doré* responsable de l'épidémie. La source de l'infection semblait ainsi trouvée. Or, on apprit plus tard que d'autres intoxications s'étaient produites dans d'autres écoles, où l'on avait utilisé des boîtes du même lait en poudre provenant du même lot de fabrication, épidémies au cours desquelles on isola toujours *le même type de Staphylocoque doré*. On fut ainsi amené à admettre que le premier cuisinier s'était infecté au contact du lait, alors qu'on avait pensé que c'était le contraire qui s'était produit.

L'infection des produits alimentaires peut être primaire ou secondaire :

1) *L'infection primaire* est principalement imputable au lait, tant de vache que de chèvre. D'après WORSECK (46) les Staphylocoques

dorés isolés de vaches atteintes de mastitite se sont montrés entérotoxigènes dans 66,67 % des cas. KRASSICKAJA (47) considère comme une des sources principales des toxi-infections alimentaires les produits à base de lait de vaches atteintes de mastitite et rapporte qu'en 1958 46 % de toutes les toxi-infections alimentaires dues à des Staphylocoques *en Russie* provenaient de produits laitiers.

2) *L'infection secondaire* des produits alimentaires a toujours lieu au cours de la fabrication par l'intermédiaire d'une personne souffrant d'une staphylococcie ou qui est porteur de germe. On sait aujourd'hui que cette voie d'infection est de beaucoup la plus fréquente.

L'hospitalisme staphylococcique :

Sous le terme d'« *hospitalisme staphylococcique* » on groupe toutes les affections dues aux Staphylocoques et apparaissant au cours des hospitalisations, aussi bien pendant le traitement clinique qu'indépendamment de celui-ci. Ce qui revient à dire que tous les processus staphylococciques observés dans une clinique ne sont pas forcément imputables à l'hospitalisme auquel appartiennent d'autres qui ne se manifestent qu'après la sortie de clinique du malade.

Pour l'interprétation de chaque cas individuel, il y a lieu de considérer d'une part l'*aspect clinique*, et d'autre par *l'aspect bactério-épidémiologique*. Ce dernier dépend de l'agent causal. Comme les « *Staphylocoques hospitaliers* » présentent souvent des caractéristiques d'un type donné, il est assez aisé de déterminer leur origine dans la plupart des cas. C'est ainsi que par exemple, pour la plupart des cas de mastitite non transmise par le nourrisson chez des femmes ayant accouché en clinique, il est possible d'isoler des souches « *hospitalières* », même si la maladie ne s'est déclarée que quelques semaines après la sortie de clinique. C'est pourquoi ces mastitites sont englobées du point de vue épidémiologique parmi les *infections hospitalières*. Par contre, du point de vue clinique, on pourrait argumenter que la durée du temps de latence ferait plutôt rechercher la véritable origine de la maladie non pas dans l'agent causal, mais dans certains facteurs du milieu familial qui stimuleraient la prédisposition du sujet à la maladie.

Le terme de « *hospitalisme staphylococcique* » n'est devenu courant que depuis peu, après la publication, par de nombreuses cliniques du monde entier, de cas d'infections staphylococciques. A ce sujet, il faut tenir compte du fait que les patients des cliniques constituent, par leur état physiologique et leur réceptivité, un milieu de choix pour l'expansion de telles infections. Il n'est donc pas question d'établir une statistique comparative avec le reste de la population. Mac DERMOTT et ses collaborateurs (48) sont d'avis que l'on a donné beaucoup trop d'importance à ces *infections hospitalières*. L'étude *des cas hospitaliers d'infections staphylococciques* a démontré que leurs conditions d'apparition peuvent être très différentes d'une clinique à l'autre, voire même d'un cas à

l'autre dans une même clinique. Il s'agit d'un processus qui ne peut être considéré comme spécifique quant à l'agent infectieux ou à un autre facteur causal. De toutes façons, l'*hospitalisme* d'aujourd'hui n'est pas restreint aux seules infections staphylococciques, et le diagnostic nécessite dans tous les cas une analyse pour déterminer les caractères spécifiques de l'agent responsable ainsi que les autres causes de l'infection.

L'agent causal :

Certains auteurs ont émis l'opinion que *l'hospitalisme staphylococcique* est provoqué par une forme pénicillinorésistante de *Staphylococcus aureus*. Certains cliniciens ont alors cru pouvoir affirmer qu'il s'agissait en fait d'une épidémie mondiale de staphylococcies, liée aux cliniques et provoquée par un type bien déterminé de *Staphylococcus aureus, dont le caractère principal serait la pénicillinorésistance*. Mais la lysotypie a démontré qu'au cours des infections hospitalières, les Staphylocoques dorés sont souvent différents d'une clinique à l'autre, voire même d'un service à l'autre dans un même établissement. Cependant, l'étude de Staphylocoques dorés provenant d'infections « extra-cliniques » a prouvé qu'il s'agit dans la plupart des cas de *germes pénicillinosensibles ;* lorsqu'on rencontrait des germes résistant aux antibiotiques, on pouvait le plus souvent découvrir que le malade avait été en contact direct ou indirect avec une clinique. De plus, il faut noter que les souches isolées hors des établissements hospitaliers présentent un très grand nombre de types différents, alors que pour les souches hospitalières, on retrouve le même petit groupe de types. De plus, ces germes présentent toujours *une résistance à la Pénicilline* et souvent à d'autres antibiotiques encore.

Poehn (49) différencie des « *types hospitaliers* » et des « *types individuels* ». Ces derniers sont couramment introduits dans les cliniques par les malades, le personnel ou les visites. Certains auteurs sont d'avis que les souches hospitalières acquièrent une virulence accrue, ce qui est controversé par des observations épidémiologiques. Ainsi, W. Meyer conclut de son expérience personnelle que dans beaucoup de cliniques il est possible d'isoler des *Staphylocoques dorés présentant tous les caractères des souches hospitalières*, mais qui n'ont provoqué aucune infection reconnue. Il est fréquent également de trouver deux ou même plusieurs de ces souches en même temps, et dont la virulence peut être différente. On a même vu *deux souches de même lysotype*, mais présentant un antibiogramme différent, dont l'une seulement est apte à provoquer une infection.

Williams donne quelques exemples du comportement épidémiologique de souches staphylococciques: Une souche se trouvait depuis 6 mois dans un service hospitalier, largement répandue dans l'air et les poussières, sans jamais provoquer de maladies, et ne pouvant être identifiée que rarement dans l'appareil rhino-pharyngé des patients; une autre souche ne provoquait pas non plus d'infections, mais se retrouvait fréquemment dans l'appareil rhino-pharyngé des malades ; une troisième souche, par contre, provoquait en l'espace de deux mois 34 infections de plaies : elle était largement répandue dans l'air et les poussières, mais ne se retrou-

vait que rarement dans le nez des malades. D'autres observations du même ordre sont rapportées par Schmidt et Lenk (50), Milch (51), Matejovska et Raska (52), Williams et Jevons (53).

Krepler (54) et Schmidt (55) emploient le terme « d'*hospitalisme latent* » lorsqu'il s'agit de souches hospitalières à virulence réduite. Ce terme laisse supposer l'existence d'une menace de danger, résidant dans le fait que cette virulence pourrait être accrue par certains facteurs. Mais comme il ne s'agit là que d'une hypothèse, nous croyons prématuré d'employer le terme préconisé par ces auteurs.

D'autre part, il n'est pas rare de voir des malades sortant de clinique infecter des personnes de leur entourage par des germes hospitaliers; on pourrait parler dans ces cas d'un « *hospitalisme indirect* ». La dispersion de Staphylocoques résistant aux antibiotiques parmi la population pourrait parfois trouver là une explication.

Origine des Staphylocoques responsables des infections hospitalières :

Comme sources primaires de l'hospitalisme staphylococcique, on peut considérer :

1) Patients souffrant de staphylococcies :

Il peut s'agir d'une maladie faisant l'objet des soins hospitaliers, mais il n'est pas rare que l'infection staphylococcique soit secondaire et a passé inaperçu au début.

Les infections staphylococciques les plus importantes au point de vue épidémiologique sont celles qui provoquent une apparition massive de *Staphylococcus aureus* et occasionnent des pyodermies en grandes surfaces, des eczémas surinfectés, des bronchites suppurées, des abcès pulmonaires pouvant être contagieux pour le nouveau-né.

2) Sujets sains porteurs de germes :

Comme nous l'avons déjà vu, ceux-ci doivent être recherchés soit parmi les malades, soit parmi le personnel de la clinique. W. Meyer est d'avis que beaucoup d'auteurs donnent trop d'importance à ce dernier et il pense que dans une clinique, le nombre des malades passant dans un service étant plus important que celui du personnel soignant, ils peuvent ainsi constituer une importante source de germes. Pour incriminer le personnel, on a fait ressortir que les souches hospitalières sont toujours résistantes aux antibiotiques et que l'on trouve très souvent de telles souches sur le personnel des hôpitaux. Mais, de même, ces souches peuvent se trouver chez des patients, surtout s'ils ont déjà fait un séjour en clinique et ont été traités aux antibiotiques. C'est pourquoi, il faut tenir compte des deux possibilités d'infection.

Influence des antibiotiques :

En se basant sur le fait que dans la « *nouvelle forme d'hospitalisme* » on a déterminé presque exclusivement *des Staphylocoques résistant* aux antibiotiques, KIKUTH et GRÜN (56) estiment que cette infection est due en grande partie à l'emploi des antibiotiques; ils insistent sur le fait que la flore bactérienne physiologique est profondément modifiée par ces derniers, ce qui a pour effet de déclencher une réaction de défense importante. Ces auteurs ne pensent pas qu'une hygiène déficiente peut constituer une cause primaire de « *l'hospitalisme staphylococcique* ».

Comme nous l'avons déjà dit, de nouvelles souches de Staphylocoques sont constamment véhiculées dans les cliniques : par les malades nouvellement admis, les visites, etc... malgré celà, il n'existe que quelques « *souches hospitalières* »; cela est dû en premier lieu à une sélection des souches résistantes, au contact des antibiotiques. GOULD (57) a prouvé qu'au cours de la pénicillinothérapie, les petites quantités d'antibiotique qui se répartissent dans l'air et sur les poussières de l'air suffisent pour inhiber les Staphylocoques sensibles entraînant ainsi une sélection. C'est pour cette raison qu'il serait urgent de réduire l'emploi systématique des antibiotiques. Cependant, les observations des différents auteurs sont encore contradictoires en ce qui concerne l'effet de l'emploi des antibiotiques sur la flore staphylococcique hôte d'un hôpital. Certains, par exemple, rapportent une diminution rapide *des Staphylocoques* après l'emploi de *la Pénicilline*, alors que d'autres n'ont pu noter qu'une régression très lente. Il semble donc qu'une étude approfondie de ce problème soit encore nécessaire.

En résumé, on peut dire que « *l'hospitalisme staphylococcique* » *se manifeste surtout dans les maternités, les cliniques chirurgicales et les services de pédiatrie.*

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES STAPHYLOCOQUES ET DE LEUR PATHOGÉNÉITÉ PAR LA RÉACTION DE COAGULASE

La propriété des Staphylocoques de *coaguler le plasma oxalaté*, en particulier celui de l'homme et du lapin, est actuellement considérée à juste raison comme le meilleur test de leur pathogénéité. Cette propriété a été mise en évidence par Delezenne (58), découverte qui fut confirmée en 1903 par Loeb (59) et utilisée pour la première fois en 1908 par Much (60) pour la différenciation des souches pathogènes et saprophytes.

Cette réaction a ensuite été étudiée plus en détail par Gross (61) et par Kemkes (62), travaux qui ont été poursuivis par de nombreux *chercheurs anglo-saxons, français et italiens*, parmi lesquels nous ne citons que Christie et Keagh (63), Chapman et ses collaborateurs (64) et Bruschettini (65).

Cette méthode, qui est spécifique pour différencier *les Staphylocoques virulents*, est habituellement effectuée dans des tubes à hémolyse et a donné lieu à de nombreuses variantes, portant sur l'emploi de sang ou de plasma d'origines diverses et utilisé pur ou dilué, auquel on ajoute différentes substances anticoagulantes à concentration plus ou moins forte. Toutes ces modifications conditionnent la durée de l'expérience.

Les produits anticoagulants agissant aux dilutions les plus poussées et de la manière la moins brutale sur la coagulation, tels que le *citrate, l'oxalate et le fluorure de sodium, l'héparine et l'hirudine*, sont les plus recommandés. Mais d'après Lominski et Roberts (66) leur concentration n'influerait pas sur la réaction : Bien que selon Gonzenbach et Uemura (67) une dilution de 1 % d'oxalate de sodium soit suffisante pour inhiber la coagulation naturelle du sang, on peut sans inconvénient employer jusqu'à 8 % de citrate de sodium ou 580 unités d'héparine [Otte et Walter (68)] pour 0,2 ml de plasma au cours de la réaction de coagulase.

Le choix du plasma, par contre, a une très grande importance. Bien que *les Staphylocoques pathogènes* coagulent la plupart des plasmas de mamifères, le temps de coagulation peut varier d'une sorte de plasma à l'autre. Gross (69) donne les temps suivants : plasma de lapin : 1-2 heures; plasma de cheval : plus de 2 heures; plasma de mouton et de chèvre : début de coagulation après plusieurs heures, et pour le plasma de bovidés même après 24 heures seulement. Pour une espèce de plasma donné, les résultats peuvent être inconstants, comme l'a démontré Much en 1908 avec du sang de plusieurs moutons. Ce phénomène est encore plus marquant pour le *plasma humain*, puisque Gross rapporte des cas où la coagulation débute après 1 à 2 heures, pour d'autres après 4 à 5 heures, pour d'autres encore on ne notait aucune coagulation. Ces différences sont imputables — abstraction faite de la teneur en activateurs du plasma — à des *facteurs frénateurs* (inhibiteurs, anticoagulases) qui n'apparaissent qu'en quantité réduite dans les plasmas de lapin ou de cheval ainsi que dans certains plasmas humains. C'est pourquoi on a adopté le plasma de lapin dans la pratique courante. L'emploi du plasma humain se justifie également, principalement si l'on a pris soin de contrôler l'absence d'inhibiteurs à l'aide de souches staphylococciques faiblement coagulantes, ou par titration au moyen d'une coagulase-étalon, d'après Clapper et Wood (70). Mais comme l'action des inhibiteurs est réduite par la dilution du plasma, il suffit d'employer celui-ci à des taux de 1/10 ou 1/4.

Les inhibiteurs de coagulase sont largement répandus. Lominski et Roberts ont trouvé 60,9 % de sérums contenant des anticoagulases pour 348 échantillons examinés. Bekker (71) a examiné 100 sérums humains parmi lesquels 37% étaient fortement inhibants et 58% moyennement. 5 % de ces sérums seulement étaient absolument dépourvus de substances inhibitrices.

Au point de vue constitution, Kaplan et Spink (72) ont montré que les anticoagulases faisaient partie de la *fraction euglobulinique* du plasma, et Bekker les range principalement dans les α- et β-*globulines*. Elles résistent à un chauffage à 63° pendant 30 minutes et sont détruites par un chauffage de 30 minutes à 70°. Jusqu'à présent, les opinions diffèrent sur leur *état d'anticorps*. Ainsi Mercier, Pillet et Pery (73) nient leur appartenance à ces facteurs, tandis que Lominsky et Roberts, Bekker, Kaplan et Spink sont dans le doute. Actuellement, des auteurs tels que Dutilh (74), Lack et Walling (75) considèrent la coagulase comme un *antigène proprement dit.*

En ce qui concerne la technique de détermination, Gross préconise la lecture après 1 - 2 - 3 - 4 et 24 heures pour le plasma de lapin à la température de 37°. Ces observations se justifient, puisqu'en présence d'un taux élevé de *fibrinolysine*, la liquéfaction du coagulum peut déjà se faire après 2 heures, tandis que des souches faiblement coagulantes peuvent solidifier le plasma après 24 heures seulement. La quantité de l'inoculat ne joue guère de rôle, étant donné que son influence ne se fait sentir que pour de très petites quantités; ainsi, l'emploi de 1/100e d'öse de Staphylocoques ne retarde que d'une heure la coagulation du plasma

de lapin. Gross a constaté que 1/10 000e d'öse de Staphylocoques pathogènes donne encore une réaction de coagulase positive, mais avec un retard de 20 à 36 heures. Il paraît que la *constitution du milieu de culture* joue un rôle dans la vitesse de la réaction. Ainsi Chapman recommande un milieu de *protéose-lactose-agar à 7,5 % de chlorure de sodium* qui augmente le pouvoir coagulant. Parmi 100 souches, 91 étaient coagulase-positives après une culture de 12 heures sur ce milieu, tandis que 77 % donnaient une réaction positive si on les prélève sur un milieu courant. D'après cet auteur, le facteur essentiel de ce milieu serait le *chlorure de sodium*. Fusillo et Jaffurs (76) citent encore de meilleurs résultats en employant comme substrat *l'Arginine-Yeast-Medium Difco* dans lequel l'acide aminé doit stimuler la formation de coagulase. Penfold (77), Reid et Jackson (78) recommandent une méthode en boîte de Pétri pour contrôler les réactions de coagulase. Woods et Parkin (79) ainsi que Clapper et Wood n'ont pu confirmer les résultats des auteurs précités. En examinant 86 souches coagulase-positives et 65 coagulase-négatives en présence de *plasma humain oxalaté*, Woods et Parkin ont obtenu 95,3 % de réactions positives en boîtes de Pétri et les Staphylocoques coagulase-négatifs donnaient des résultats faussement positifs dans une proportion de 7,7 % après 4 heures et de 33,8 % après 24 heures au moyen de la méthode en tubes. *Il semble donc que la technique en boîtes de Pétri soit supérieure à celle en tubes.* Ce fait peut s'expliquer, puisque le test de coagulase n'est pas une réaction spécifique, quatre substances intervenant dans ce phénomène, à savoir : *la coagulase*, *la β-toxine staphylococcique* et *deux autres produits métaboliques* qui ne sont pas nettement définis et se trouvent particulièrement dans les souches coagulase-négatives. Woods et Parkin conseillent donc, pour la méthode en boîte de Pétri, *une gélose à fibrinogène* et non pas une gélose au plasma. La lecture doit être effectuée au bout de 4 heures. De cette façon, ces auteurs n'ont obtenu que 2,6 % de réactions faussement négatives et aucune réaction faussement positive en éprouvant 151 souches.

Il faut d'autre part prendre en considération *que la coagulasogenèse n'est pas une propriété stable* des Staphylocoques. Ainsi, Chapman et ses collaborateurs ont examiné 173 souches à un mois d'intervalle et n'ont trouvé que 96,9 % de concordance après ce délai. Hallman (80), qui a examiné 233 souches, a pu constater *que les cultures initiales peuvent être négatives et devenir par la suite coagulase-positives*. Cette observation a été confirmée par Oker-Blom (81) puis par Kosunen et Parmala (82), sans trouver son explication jusqu'à ce jour. On a essayé de l'expliquer par des modifications du métabolisme bactérien, comme Chapman, Fusillo et Jaffurs les ont démontrées; cependant, les expériences ultérieures de Jacherts (83) contredisent cette opinion, puisqu'il a constaté que la production de coagulase est en rapport direct avec le métabolisme régissant la multiplication cellulaire, et d'après cet auteur *le genèse de la coagulase précède la division cellulaire*. D'après Grün, les relations métaboliques étroites entre la coagulasogenèse et la scissiparité donnent l'explication de la diminution de la production de coagulase

chez des Staphylocoques soumis à l'action des antibiotiques. Par contre, la résistance des souches aux antibiotiques est sans influence sur leur production de coagulase.

La préparation de *coagulase exogène*, donc dépourvue du corps bactérien, s'est avérée très difficile. Moese et Laurentschitsch (84) ont écrit en 1950 qu'il est douteux que des Staphylocoques vivants soient nécessaires pour réaliser le phénomène de coagulation. Dans ces dernières années, on a réussi à isoler des substances coagulantes extracellulaires. Jacherts a pu purifier en 1956 des coagulases par chromatographie sur l'*oxyde d'alumine* et électrophorèse consécutive. La fraction coagulase active ne migre pas. L'auteur a obtenu au moyen de cette technique une activité cent fois accrue de la coagulase utilisée.

En employant comme antigène de la coagulase exogène, Rammelkamp et ses collaborateurs (85) ont pu réaliser chez le singe une production d'anticorps; ils ont ainsi mis sérologiquement en évidence l'existence de trois coagulases différentes. Duthie (86) a également isolé trois sortes de coagulases en immunisant des lapins. Chez l'homme, il a pu déceler une quatrième coagulase par la genèse d'un anticorps spécifique. En ce qui concerne la fréquence de ces différentes coagulases, Duthie a montré que la *coagulase A* est la plus répandue; elle existe dans 76 % des Staphylocoques humains examinés ; 12 % de souches forment la *coagulase D*. On a également mis en évidence des *formes AD*. En examinant sérologiquement 45 sérums de sujets sains, 84 % étaient anti-A et 92 % anti-D. Il est intéressant de remarquer qu'il n'y avait aucune relation entre le taux des anticorps inhibiteurs et celui des antitoxines.

La coagulase est détruite par la pepsine et la trypsine. Les données concernant sa sensibilité à la chaleur varient selon les auteurs : d'après Jacherts, elle supporterait un court chauffage à 100°; Otte et Walter indiquent qu'une ébullition de deux heures est sans effet, et Walker et ses collaborateurs sont d'avis qu'un chauffage de 20 minutes à 120° n'enlève rien à son activité. Cette haute thermostabilité, son insensibilité aux variations de pH (pH 2,0 à 12,0) ainsi que sa stabilité vis-à-vis de l'acide acétique à 30 % ont fait douter de la nature enzymatique de la coagulase.

La substance élaborée par *les Staphylocoques* n'est pas capable, par elle-même, de provoquer la coagulation du plasma, elle nécessite pour cela un activateur, découvert par Smith et Hale (87) qui lui ont donné le nom de « *coagulase reacting factor* » ou « *serum-co-factor* » : Kaplan et Spink l'ont décelé en grandes quantités aussi bien dans le sérum humain que dans celui du lapin, d'où ils ont pu l'isoler par précipitation au *sulfate d'ammonium*. Cet activateur supporte un chauffage de 30 minutes à 100° et reste actif pendant au moins 10 heures à des pH allant de 2,0 à 10,0. Kaplan et Spink, ainsi que Gerheim, Ferguson et Travis (88) le rangent parmi les *albumines*, alors que Tager (89) est d'avis qu'il fait partie de la *fraction I des euglobulines*. Duthie et Lorenz lui trouvent une analogie avec la *prothrombine*, cependant Tager a réussi en 1954 à sépa-

rer électrophorétiquement deux activateurs, dont l'un migre avec la prothrombine et l'autre entre les β- et les γ-globulines. Des expériences ultérieures de Tager (1956) ont montré que la prothrombine ou certains constituants dégradés qui en dérivent peuvent agir comme des activateurs. Tout ceci démontre la complexité du processus de coagulation du plasma par les Staphylocoques. Le coagulum obtenu se rapproche sensiblement d'un coagulum de plasma normal, mais possède cependant une solubilité différente et Lieb et Nothhacksberger (90) en déduisent qu'ils ne sont pas identiques.

Si l'influence de la coagulase dans les infections staphylococciques a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques, les divers auteurs n'ont pu jusqu'à présent faire concorder leurs opinions. Partant de la possibilité de coaguler le plasma « *in vitro* » par la coagulase, Gross a effectué des expériences sur le lapin en 1933, au cours desquelles il lui a été possible de provoquer la formation d'un thrombus par une coagulase exogène ; cet essai n'avait cependant pu être réalisé que dans une veine jugulaire ligaturée de lapin. Gross pensait avoir ainsi découvert l'origine des thromboses survenant chez des malades atteints de *staphylococcies*. Mais cette opinion a été réfutée par Lack et Walling ainsi que par d'autres auteurs, qui n'ont pas pu observer la formation d'un coagulat par la coagulase au cours d'essais sur les animaux. Ces auteurs font plutôt mention *d'une chute du taux sanguin de fibrinogène* après l'injection de coagulase, *et par suite un retard dans la coagulation du sang*. Il a fallu à Smith et Johnston (91) des doses de coagulase très importantes pour obtenir un exitus immédiat des animaux d'expérience par suite d'une coagulation totale du sang. Boake (92) impute également à la coagulase *le mécanisme d'attaque au cours des infections staphylococciques*. Il lui a été possible d'obtenir une diminution de la virulence *de Staphylocoques coagulase-positifs* grâce à des inhibiteurs obtenus par une immunisation active de lapins à l'aide de coagulase exogène. La plupart des chercheurs cependant voient dans *l'activité coagulante un mécanisme de défense des Staphylocoques contre la phagocytose*, parce que les germes, protégés par un manteau de fibrine, peuvent se multiplier impunément dans l'organisme, jusqu'au moment où, libérés par leur activité fibrinolytique plus tardive, ils provoquent la nécrose cellulaire au moyen de leur différentes toxines et enzymes. D'autre part, Ekstedt et Nungester (93) tirent de leurs essais la conclusion suivante : *la coagulase éliminerait certaines substances bactériostatiques du sérum et donnerait ainsi aux Staphylocoques la possibilité de se fixer dans l'organisme*. Ils admettent cependant la possibilité que le facteur responsable de cette action ne soit pas la coagulase elle-même, mais plutôt une autre substance adhérant à elle.

Expériences proprement dites :

Pour contrôler le pouvoir coagulant des *Staphylocoques*, nous avions à notre disposition 50 souches pathogènes d'origine humaine, sélection-

nées parmi un grand nombre de Staphylocoques pathogènes pour l'homme ou les animaux.

Pour la réaction, nous avons utilisé des cultures de 24 heures sur *gélose au sang ;* au moment de l'expérience, nous prélevons une petite öse de ces cultures que nous introduisons dans du *plasma de lapin oxalaté.* Ce dernier est obtenu de la façon suivante: On prélève à la veine marginale de l'oreille 5 ml de sang dans un tube à centrifuger renfermant 0,01 g d'oxalate de potasse, ou plus commodément 0,5 ml d'une solution à 2 %. On agite soigneusement pour éviter la coagulation et le mélange est ensuite centrifugé à 8 000 tr/mn pendant 10 minutes. Le plasma est recueilli par décantation et conservé à la glacière. Richou mentionne que malgré ces précautions, on a intérêt à l'utiliser frais, car à mesure qu'il vieillit, il coagule de plus en plus lentement, de plus en plus difficilement et de plus en plus irrégulièrement.

Nous avons employé ce plasma non pas à l'état pur mais dilué à 1/3 au moyen de soluté physiologique. En effet, la coagulation commence souvent dans le plasma dilué au 1/3 ou au 1/5e plus rapidement que dans le plasma pur ou dilué au 1/10e ou au 1/20e.

Pour la réaction, le plasma dilué au 1/3 a été réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 0,5 ml et additionné de prélèvements de la culture du Staphylocoque à étudier. Nous avons préféré cette technique à celle qui a recours aux Staphylocoques cultivés en milieu liquide, *puisqu'on a constaté que certains bouillons peuvent coaguler spontanément le plasma oxalaté.* Les tubes sont ensuite disposés à 37° et nous avons noté les résultats toutes les 30 minutes pendant les quatre premières heures, ceci pour le cas où le plasma préalablement coagulé serait redissous par *la fibrinolysine* élaborée par certains Staphylocoques, ce qui induirait en erreur. La lecture définitive est effectuée après 24 heures de séjour à l'étuve. Si après ce temps la coagulation fait défaut, la réaction doit être considérée comme négative. Nous avons enregistré la réaction par les signes conventionnels suivants :

— coagulation totale : +

— présence d'un petit coagulum dans le plasma liquide : ±

— plasma totalement liquide : —

Nous considérons comme *souche coagulase-positive* toutes celles qui, à un moment donné de l'expérimentation ont montré une coagulation positive, même si celle-ci est suivie d'une liquéfaction ultérieure du plasma, fait que nous avons pu observer pour huit de nos souches; deux autres ont donné après une heure un résultat ± et lors de la lecture après 2 heures le petit coagulum était déjà de nouveau dissous.

Nous reportons dans le tableau ci-contre les résultats de cette expérience en marquant d'une astérisque le premier stade de la coagulation:

TABLEAU N° 1

Souche N°	Coagulation après :				Lyse totale du coagulum				Lyse ap. 24 h	
	1 h.	2 h.	4 h.	24 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.	partielle	négative
1	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
2	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
3	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
4	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
5	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
6	+*	+	+	+	—	—	—	—	+	—
7	—	—	+*	+	—	—	—	—	+	—
8	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
11	+*	+	+	+	—	—	—	—	+	—
12	+*	—	—	—	+*	+	+	+	—	—
13	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
14	—	+*	—	—	—	+*	+	+	—	—
15	+*	—	—	—	+*	+	+	+	—	—
16	—	—	+*	—	—	—	—	—	+	—
17	—	+*	—	—	—	+*	+	+	—	—
18	+*	+	—	—	—	—	+*	+	—	—
19	—	+*	+	—	—	—	—	+*	—	—
20	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
21	±	—	—	—	+*	+	+	+	+	—
22	+*	+	—	—	—	—	+*	+	—	—
23	—	+*	+	+	—	+*	+	+	—	—
24	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
25	+*	+	+	+	—	—	—	—	+	—
26	—	+*	—	—	—	—	+*	+	—	—
27	—	+*	+	+	—	—	—	—	+	—
28	+*	+	+	—	—	—	—	+*	—	—
29	—	—	+*	+	—	—	—	—	+	—
30	+*	+	—	—	—	+*	+	+	—	—
31	+*	+	—	—	—	—	+*	+	—	—
32	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
33	—	+*	+	+	—	—	—	—	—	+
34	+*	+	+	+	—	—	—	+*	—	—
35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	+*	—	—	—	—	—	+
à reporter	17+ 18— 1 ±	12+	3+	1+	3+	4+	4+	3+		

Souche N°	Coagulation après :				Lyse totale du coagulum				Lyse ap. 24 h	
	1 h	2 h	4 h	24 h	2 h	3 h	4 h	24 h	partielle	négative
Report:	17+ 18— 1 ±	12+	3+	1+	3+	4+	4+	3+		
37	+*	—	—	—	+*	+	+	+	—	—
38	+*	+	—	—	—	+*	+	+	—	—
39	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
40	—	+*	+	—	—	—	—	+*	—	—
41	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
42	+*	+	+	+	—	—	—	—	+	—
43	±	—	—	—	+*	+	+	+	—	—
44	+*	+	+	+	—	—	—	—	+	—
45	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
46	+*	+	+	—	—	—	—	+*	—	—
47	+*	+	+	—	—	—	—	+*	—	—
48	+*	+	+	+	—	—	—	—	—	+
49	—	—	+*	—	—	—	—	+*	—	—
50	+*	+	+	—	—	—	—	+*	—	—
Totaux :	28+ 20— 2 ±	13+	4+	1+	5+	5+	4+	8+	9+	17+

Si l'on calcule les pourcentages par rapport aux 50 souches expérimentées, on obtient les valeurs suivantes :

TABLEAU N° 2

	Contrôle après				
	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Coagulation totale	56 %	26 %	—	8 %	2 %
Lyse totale du coagulum	—	10 %	10 %	8 %	16 %
Lyse partielle après 24 h					18 %
Pas de lyse après 24 h					34 %

De plus, il faut noter que deux souches, soit 4 % (N^os^ 9 et 35) sont restées *totalement négatives ;* ce phénomène peut être dû à l'absence de coagulase ou à un excès de fibrinolysine.

Quant aux souches pathogènes mises à l'épreuve, on constate que 66 %

d'entre elles sont *productrices de fibrinolysine, dont* 8 % *avec un pouvoir protéolytique assez prononcé.* On se rend ainsi compte de l'importance du contrôle simultané des *propriétés coagulantes et fibrinolytiques* des Staphylocoques pathogènes.

Nous admettons donc, avec la plupart des auteurs, que *tous les Staphylocoques donnant une réaction de coagulase positive doivent être considérés comme pathogènes pour l'homme.* Pour contrôler la véracité de cette assertion, nous avons effectué d'autres essais analytiques sur nos 50 souches de Staphylocoques pathogènes.

CHAPITRE IV

LE PROCESSUS DE FIBRINOLYSE

D'après Gratia (94), *il existe un certain parallélisme entre l'action coagulante et la propriété fibrinolytique des Staphylocoques.* Les plasmas qui se coagulent le plus rapidement seraient aussi ceux qui subissent le plus vite la fibrinolyse. Ainsi, cet auteur déclare : « *Il est facile de vérifier qu'un Staphylocoque qui vient de fibrinolyser un caillot est capable non seulement d'en fibrinolyser d'autres, mais a encore conservé inaltérées ses vertus coagulantes à l'égard du plasma oxalaté normal. Le même Staphylocoque est coagulant en présence de fibrinogène et fibrinolytique en présence de fibrine. Il y a là un phénomène comparable à l'action coagulante puis protéolytique que le ferment lactique exerce sur le lait* ».

L'opinion de Gratia est confirmée par Gengou (95) qui a montré « *qu'une solution limpide et transparente de fibrinogène devient visqueuse et prend ensuite l'aspect d'un caillot mou, ne persistant que pendant un temps assez court, puis redevient visqueuse et se liquéfie entièrement* ».

Les résultats semblent assez discordants en ce qui concerne les souches produisant la fibrinolyse. Aoi (96) trouve que 88 % des souches de Staphylocoques provenant de foyers purulents et 68 % des souches d'autre origine sont douées de propriétés fibrinolytiques. Madison (97) constate que 77 % des 78 souches examinées, provenant d'infections cutanées humaines, n'étaient pas fibrinolytiques, alors que 90 % des 30 souches provenant d'infections profondes (septicémies, empyème) l'étaient. Aucune des souches vétérinaires étudiées ne possédait la propriété fibrinolytique. Netter (98) note que 15 % des Staphylocoques dorés et 13 % des Staphylocoques blancs sont fibrinolytiques. Murray-Fisher, sur 26 souches coagulant le plasma, en trouve 7 incapables de redissoudre le caillot formé par le plasma et 15 qui ne dissolvent pas le caillot de fibrinogène. Christie et Wilson trouvent 65 % de souches humaines et 8 % de souches animales fibrinolytiques. D'autre part, le fibrinogène fut décomposé et dissous sans coagulation préalable par sept souches. Ce pouvoir fait défaut dans les cultures privées de pouvoir coagulant.

Toujours d'après Murray-Fisher, tous *les Staphylocoques hémolytiques* seraient doués du pouvoir fibrinolytique. Pour Aoi, le pouvoir fibrinolytique, comme le pouvoir hémolytique et le pouvoir coagulant, serait lié au pouvoir pathogène. *Sur sept souches de Staphylocoques blancs hémolytiques, une produisait la fibrinolyse, quatre la substance anti-coa-*

gulante, deux aucune de ces substances. Sur 10 souches de *Staphylocoques non hémolytiques, aucune ne produisait la staphylofibrinolysine, mais cinq d'entre elles possédaient un pouvoir anticoagulant;* deux des souches fibrinolytiques liquéfièrent également la gélatine. Selon Pillet, Mercier et Péry (99) 82 % des souches isolées de lésions et 45 % des souches provenant des fosses nasales de sujets cliniquement sains sont fibrinolytiques. Pour Rountree (100) la production de *toxine* β exclut automatiquement la production de la *fibrinolysine.* Mercier trouve que cette conclusion est trop absolue. Lack (101) a étudié 27 souches de Staphylocoques et pense que ce germe produit, non pas une vraie fibrinolysine, *mais un activateur du plasminogène.*

Différentes méthodes ont été élaborées pour mettre en évidence la production de fibrinolysine par les Staphylocoques.

Kourilsky et ses collaborateurs donnent la préférence à la méthode de Christie et Wilson (103), plus sensible que celle de Tillet et Gardner, mais à l'inverse de Christie et Wilson, qui se servent de fibrinogène de mouton, ils utilisent du *fibrinogène de lapin* qui leur paraît beaucoup plus sensible. Ils recommandent la technique suivante : Le plasma oxalaté à 2 % est chauffé à 56° pendant 10 minutes; la fibrine précipitée est recueillie par centrifugation et reprise dans le soluté physiologique en quantité égale à celle du plasma primitif. On dépose 1 ml de cette suspension dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre dans laquelle on coule ensuite 6 ml de gélose à 3 % ramenée à 50°. On mélange rapidement et on laisse solidifier. Les souches à étudier sont ensemencées en 4 à 5 points déterminés de la surface. Sur cette boîte de gélose opacifiée par la fibrine, la lecture se fait facilement après 12 heures de séjour à l'étuve à 37°. Dans les cas positifs, on observe une auréole transparente due à la lyse de la fibrine tranchant sur le fond opaque de la plaque.

Il existe une méthode indirecte, qui a été contrôlée par Richou et ses collaborateurs. La fibrine préparée comme précédemment est diluée à 1/10 par le soluté physiologique, puis répartie dans une série de tubes à raison de 1 ml. On porte alors dans ces tubes des quantités variables de filtrat de culture du Staphylocoque en expérience : 1 — 0,5 — 0,3 — 0,2 — 0,15 — 0,1 ml, etc... Après avoir fermé les tubes à l'aide d'un bouchon de caoutchouc et bien mélangé le contenu, on les porte à l'étuve à 45° pendant 24 heures. A la sortie de l'étuve, on constate que certains mélanges, dans lesquels la fibrine a été lysée, sont devenus parfaitement limpides, alors que ceux dans lesquels la réaction est négative restent troubles.

Lorsque 1 ml de filtrat de culture lyse la fibrine contenue dans 1 ml de suspension, Richou définit ce filtrat comme titrant « 1 *unité fibrinolytique* ». Ce titre sera de 3 unités si la lyse est obtenue avec 0,33 ml de filtrat; de 10 unités si elle est obtenue avec 0,1 ml de filtrat, etc...

En se basant sur les travaux de Frey (104) concernant le dosage *des Streptokinases* et *Antistreptokinases*, Eckner (105) a mis au point une

technique de dosage de la fibrinolysine au moyen de plasma oxalaté coagulé par recalcification, en utilisant un système de coagulation artificiel constitué par une solution de fibrinogène à 0,6% et une solution de thrombine à 2 unités. Il utilise le fibrinogène de bœuf *Sigma*, qui est hautement purifié et possède des propriétés coagulantes constantes. La thrombine est fournie par la *Thrombase Roussel* (10 mg/5 ml). Il contrôle les solutions culturales à la dose de 0,5 — 0,2 — 0,1 — 0,05 ml, etc... En procédant de cette façon, il obtient la coagulation de tout le substrat réactionnel après 5 minutes et la lyse commence à se manifester après 10 minutes dans les tubes à concentration de fibrinolysine maximale. L'auteur conclut que les *Staphylocoques dorés virulents d'origine humaine* sont producteurs de fibrinolysine dans 80 % des cas, les souches humaines non pathogènes sont fibrinolytiques dans 10 % des cas. Ceci confirme les constatations de Pillet et de ses collaborateurs (106) qui ont comparé la valeur *du test de fibrinolysine avec celle du test de la coagulase* et trouvent les résultats comparables d'emblée. *Ce qui conduit à penser que la propriété de fibrinolyser le plasma comme celle de le coaguler vont de pair et sont toutes deux caractéristiques des Staphylocoques pathogènes.* On se rend ainsi compte de l'importance de cette épreuve.

Nous n'avons pas employé la méthode d'Eckner parce que nous voulions caractériser *nos Staphylocoques* à l'aide d'une technique facilement utilisable dans la routine clinique. A ce sujet, Grün recommande la technique des boîtes de Pétri de Christie et Wilson plutôt que la méthode indirecte en tubes à hémolyse et Chapman est du même avis, puisque la technique des boîtes de Pétri fournit des résultats plus concordants dans un temps relativement plus court, ne dépassant pas 24 heures. Certains auteurs recommandent l'emploi de sérum humain ou de cheval qui donne des réactions positives plus nombreuses et plus intenses que le sérum de lapin.

Expériences proprement dites :

Pour nos expériences nous avons eu recours, comme Kourilsky et Grün le préconisent, à du *plasma de lapin* et à la technique de Chapman.

Comme substrat, nous avons employé :

Extrait de viande	0,45 g
Bacto-peptone	0,75 g
Chlorure de sodium	0,90 g
Gélose	2,25 g
Eau distillée	130,00 ml

On dissout par chauffage, on ajuste à pH = 7,0 puis on stérilise. Après refroidissement à 50°, on ajoute 20 ml de plasma de lapin, on mélange soigneusement et on inactive pendant 5 minutes à 56°, d'après les données de Chapman. Nous avons remarqué que cette température était insuffisante pour précipiter le plasma gélosé et avons chauffé pour cette raison à 60° pendant 5 minutes.

On transvase ensuite le milieu dans des boîtes de Pétri pour obtenir une couche de 5 mm de hauteur. On laisse solidifier en position horizontale. On ensemence en stries à raison de 5 à 6 souches par boîte. Les souches doivent être cultivées auparavant sur gélose au sang pendant 24 heures. La lecture est effectuée après 24 heures de séjour à l'étuve à 37°. On observe, pour les souches à fibrinolysine, une zone translucide de 5 mm environ. Les souches dépourvues de fibrinolysine ne modifient pas l'opacité de la gélose. Des souches moins fibrinolytiques donnent seulement une zone translucide étroite, continue ou interrompue par places.

Nous avons ainsi examiné nos 50 souches et avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 3

Résultat	Nombre obtenu	Pourcentage
Fibrinolysine franchement positive	34	68 %
Fibrinolysine douteuse	8	16 %
Fibrinolysine négative	8	16 %

Interprétation :

Nous voudrions tout d'abord mentionner que d'après nos essais le plasma de lapin se prête très bien à cette réaction de la fibrinolyse.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus lors de la réaction de coagulase, nous avons pu constater pour cette dernière que 44 % des souches donnaient une lyse complète de coagulum dans les 24 heures, 18 % une lyse partielle et 34 % pas de lyse dans ce temps, alors que dans la réaction de fibrinolysine nous trouvons 68 % de souches positives, 16 % douteuses et seulement 16 % négatives. On voit ainsi l'importance de l'emploi simultané de ces deux tests pour *la mise en évidence de la pathogénéité des Staphylocoques.*

Dans la réaction de coagulase, on pourrait s'expliquer l'absence de fibrinolyse chez 34 % des souches par la présence de β-*hémolysines* qui, comme on le sait, inhibent l'activité de la fibrinolysine, antagonisme qui ne peut pas s'exercer dans la réaction de Chapman.

Si l'on admet que la réaction de la coagulase est spécifique de *la pathogénéité des Staphylocoques*, on voit que la réaction de fibrinolysine donne des résultats un peu inférieurs (92 % pour la première et 84 % pour la seconde); ce qui ne veut pas dire que la fibrinolysine ne constitue pas un facteur plus sélectif de cette pathogénéité.

Nos résultats concordent sensiblement avec ceux de Grün (87 % de positifs) et sont un peu inférieurs à ceux de Kaffka (97 %) et à ceux de Christie, North et Parkin (95 %), ces derniers travaillant avec du plasma humain.

De l'ensemble de ces résultats nous croyons pouvoir conclure que le contrôle de *la pathogénéité des Staphylocoques* par le test de la fibrinolysine a une certaine importance, puisqu'un résultat positif indique indubitablement la pathogénéité; *par contre un résultat négatif ne permet pas de conclure que le germe examiné est saprophyte.* Ainsi, pour nos 50 souches de *Staphylocoques reconnues pathogènes*, nous avons 16 % de résultats négatifs quant à la fibrinolysine.

D'autre part, la *réaction de fibrinolysine* est un test appréciable pour caractériser des variantes dans *l'espèce Staphylocoque pathogène, suivant qu'elles produisent ou non la fibrinolysine.*

CHAPITRE V

LA RÉACTION DE PLASMA-AGGLUTINATION

Much a déjà constaté en employant la réaction de coagulase *que les Staphylocoques occasionnant la coagulation du plasma* au cours d'une période plus ou moins longue, *agglutinent immédiatement* quand on les incorpore dans le plasma en formant des flocons plus ou moins importants qui se déposent ensuite.

Birch-Hirschfeld (107) a donné à ce phénomène le nom de « *plasma-agglutination* » ou « *slide-test* » *des Anglo-saxons*. Tous ces auteurs reconnaissent à cette réaction une valeur sûre pour la détermination des Staphylocoques pathogènes. Ainsi Cadness-Graves et Williams (108) considèrent que la plasma-agglutination est aussi spécifique que la réaction de coagulase.

Il existe deux techniques différentes à ce sujet: d'une part, *on mélange le prélèvement bactérien directement avec le plasma*. On constate ainsi le phénomène d'agglutination immédiatement au contact des deux substances. D'autre part, *on peut préparer une suspension épaisse et homogène des bactéries dans le soluté physiologique et incorporer une trace de cette suspension dans une goutte de plasma*. L'agglutination se manifeste en 2 à 10 secondes.

Une remarque s'impose : il ne faudrait pas confondre cette agglutination en gros flocons irréguliers avec une agglutination dans le sens strict du terme, qui se manifeste par des granulations très fines et régulières et qui est beaucoup plus tardive, puisqu'on ne l'observe qu'après 2 à 5 minutes. A l'inverse de la plasma-agglutination, elle peut se produire aussi dans le sérum.

Bergey (109) impute la *plasma-agglutination* à la présence d'agglutinines naturelles dans le plasma employé, alors que Otte et Walter pensent qu'il s'agit d'une agglutination spontanée. L'origine du plasma ne semble jouer aucun rôle dans ce test : on peut employer avec le même succès du plasma humain, de bœuf ou de lapin.

Le mécanisme de la plasma-agglutination n'est pas encore élucidé. En principe, il existe deux tendances :

La plupart des auteurs considèrent le mécanisme de la plasma-agglutination et de la coagulase comme deux phénomènes différents ; on a en effet enregistré des résultats différentiels entre les deux réactions pour quelques souches. Ainsi, on a pu constater que les propriétés de coagulation

et d'agglutination pouvaient involuer différemment dans les subcultures par rapport à la culture-mère. D'autre part, on peut inhiber une des réactions sans modifier l'autre. Le chauffage du plasma à 56° pendant 4 minutes, ou l'addition au plasma de traces de *merthiolate*, empêche le pouvoir coagulant sans nuire à la plasma-agglutination. Une inhibition inverse peut s'obtenir en mélangeant 2,5 volumes de plasma avec 1 volume de solution à 28 % de *sulfate de magnésium*. On ne sait pas si la prothrombine ou le fibrinogène agissent sur le facteur d'agglutination.

Certains auteurs prétendent que la plasma-agglutination ne s'effectue pas au moyen d'une *solution pure de fibrinogène ou de sérum*. La réaction deviendrait de nouveau positive par addition d'une trace de *prothrombine*.

D'autres chercheurs, par contre, prétendent que la réaction devient positive en présence d'une solution de fibrinogène pure; d'après eux, la prothrombine ne serait pas nécessaire à la plasma-agglutination.

La seconde tendance, plus récente, est de croire que la plasma-agglutination et la réaction de coagulase sont imputables au même facteur. D'après Bergey, la membrane des *Staphylocoques pathogènes* est chargée de l'enzyme coagulant qui forme, au contact du fibrinogène du plasma, une couche de fibrine autour des germes et celle-ci est à la base de l'agglutination. Si à ce moment la bactérie sécrète la coagulase restant libre, on assiste à la réaction de coagulation. Jacherts essaie d'expliquer le comportement différent des souches de Staphylocoques dans les deux réactions, comme étant dû au comportement physique des coagulases des germes : Suivant la constitution du substrat, *la coagulase se détache ou non de la membrane de Staphylocoque*. La disparition de la réaction de coagulase peut s'expliquer par un simple phénomène quantitatif : l'inactivation du plasma à 56° peut amener une dénaturation de la plus grande partie du fibrinogène, de sorte que les faibles traces restantes ne suffisent plus qu'à la plasma-agglutination. L'emploi du *merthiolate* agit comme un bactériostatique, de sorte que l'élaboration de coagulase libre devient par la suite impossible.

Une plasma-agglutination positive est cependant assez rare chez des souches coagulase-négatives. D'après quelques chercheurs, pour des souches coagulase-négatives, on trouve de 3,5 % à 4,6 % de plasma-agglutinations positives; d'autres auteurs indiquent que pour tous les Staphylocoques coagulase-négatifs, il n'y a pas de plasma-agglutination faussement positive.

Il en est autrement pour les Staphylocoques coagulase-positifs; ici le taux des réactions de plasma-agglutinations positives est inférieur et varie entre 88 % et 99 % suivant les auteurs.

Il faut cependant attirer l'attention sur les erreurs qui ont pu se produire dans les statistiques, puisqu'il peut se former une agglutination fine, qui a pu prêter à confusion comme nous l'avons déjà dit, et qui se manifeste surtout chez les Staphylocoques coagulase-négatifs. Bergey a évalué cette cause d'erreur à 19 %.

Expériences proprement dites :

Nous avons disposé sur une lame une grosse goutte de plasma citraté de lapin, dans laquelle nous avons introduit au moyen d'un ensemenceur une petite quantité d'une suspension de culture de Staphylocoque âgée de 24 heures et cultivée sur gélose au sang. La quantité de plasma est d'environ 0,1 à 0,2 ml; elle est nécessaire car des doses moindres pourraient donner des résultats faussement positifs par formation de gros conglomérats, pouvant prêter à confusion avec une réaction positive.

On mélange soigneusement la suspension bactérienne et le plasma pour différencier la plasma-agglutination des agglutinations fines dont nous avons parlé antérieurement. *Nous avons pu constater qu'en employant des grosses gouttes de plasma, on évitait cette confusion possible.*

Les souches à plasma-agglutination positive donnent un gros conglomérat que nous désignons par le signe +; la réaction négative est caractérisée par une suspension laiteuse et désignée par le signe —; nous rangeons également dans ce groupe les souches donnant une agglutination fine. Nous rapportons les résultats de ces recherches dans le tableau N° 4.

Nous avons également examiné 50 souches de *Staphylocoques saprophytes* avec les résultats suivants:

Pour ces 50 souches de *Staphylocoques non pathogènes* la réaction de coagulase s'est avérée négative. En considérant l'ensemble de ces résultats, *on peut conclure que la plasma-agglutination est plus sensible encore que la réaction de coagulase pour mettre en évidence la pathogénéité des Staphylocoques* (94 % de résultats positifs contre 92 %). Ce fait confirme les résultats indiqués dans la littérature spécialisée.

Nous pensons pouvoir attribuer cette plus grande sensibilité au fait que *la fibrinolysine* n'a pas le temps d'entrer en action, étant donné la très courte durée de *la réaction de plasma-agglutination* contrairement à ce qui se passe dans la réaction de coagulation qui est plus longue.

En ce qui concerne les souches apathogènes, on voit que la réaction de coagulase est plus spécifique, puisqu'elle est négative à 100 %, alors que *la plasma-agglutination* donne des résultats douteux dans 18 % des cas.

On voit ainsi que *la plasma-agglutination* peut être utilement employée en clinique, puisqu'elle présente l'avantage d'être plus simple et plus rapide. Dans les cas douteux, cependant, il est nécessaire d'avoir recours en plus à la réaction de coagulase.

TABLEAU N° 4

Souche N°	Coagulase-positive	Plasma-agglutination
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	—	—
10	+	+
11	+	+
12	+	—
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	—	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	—	—
36	+	+
37	+	+
38	+	+
39	+	+
40	+	+
à reporter	37+	37+

Souche N°	Coagulase-positive	Plasma-agglutination
Report.....	37+	37+
41	+	+
42	+	+
43	—	+
44	+	+
45	+	+
46	+	+
47	+	+
48	+	+
49	+	+
50	+	+
Total	46 +	47 +
Pourcentage	92 %	94 %

TABLEAU N° 5

Plasma-agglutination	Nombre trouvé	Pourcentage
positive	0	0 %
douteuse	9	18 %
négative	41	82 %

CHAPITRE VI

TOXINES ET HÉMOLYSINES

On sait que les Staphylocoques élaborent diverses toxines, et l'on différencie aujourd'hui la toxine *léthale*, la toxine *dermo-nécrotique*, les toxines *hémolytiques* et les toxines *flocutantes*. L'ensemble de ces toxines a fait l'objet d'études de Ramon et de ses collaborateurs pour la mise au point des anatoxines.

Nous avons par conséquent tenu à caractériser nos souches de *Staphylocoques pathogènes* d'après leurs *toxines*, en tenant compte de leur ensemble, décelable sérologiquement par les antitoxines staphylococciques, et d'autre part des *hémolysines* α *et* β.

Pour la préparation des *toxines staphylococciques*, nous avons eu recours à la technique de Richou, telle qu'elle a été décrite en détail par Guillaume (110). D'après Richou et ses collaborateurs, la préparation d'une toxine active dépend grandement de la constitution du milieu de culture. D'après les auteurs français, le milieu RAP (Ramon-Amoureux-Pochon) se prépare de la façon suivante [Boivin et Richou (111)] :

On fait chauffer 3 litres d'eau du robinet à 50° au bain-marie; à ce moment on ajoute 650 g de viande de cheval hachée, débarrassée du tissu conjonctif et de la graisse. Agiter souvent et porter à nouveau à 50°, ce qui demande environ 10 minutes. On ajoute alors 5 g de *papaïne* soigneusement diluée dans un peu d'eau tiède, on fait monter lentement la température à 70°, ce qui doit prendre environ 25 minutes. D'après Richou, ce temps est très important. On arrête le bain-marie pendant 10 minutes; à ce moment, la température intérieure du flacon atteint environ 75°. On retire du bain-marie et on filtre à chaud sur *papier Chardin*. Le pH est d'habitude de 6,8 et on l'ajuste à 7,4 aussitôt après la filtration, ce qui demande environ 80 ml de *lessive de soude* à 8 % pour un volume total de 4,5 litres de bouillon ainsi préparé. On porte alors à l'autoclave à 110° pendant 15 minutes pour précipiter les phosphates et les autres substances de ballast. On filtre à chaud et on laisse refroidir jusqu'à la température du laboratoire. A ce moment le pH est d'environ 7,8 à 8,0; on le réajuste à 7,4 à l'aide d'*acide chlorhydrique pur*. Il faut environ 2,75 ml pour 3 litres de bouillon. On répartit ensuite en tubes

que l'on stérilise pendant 45 minutes entre 112°-115°. Les cultures de Staphylocoques doivent être pratiquées en atmosphère de 20 % *d'anhydride carbonique*. A ce sujet, nous avons employé le dispositif déjà utilisé par Mademoiselle Guillaume.

La souche-mère doit être cultivée sur milieu gélosé et âgée de 4 à 6 jours. La culture en atmosphère de CO^2 doit s'effectuer à 27° pendant 7 jours, condition optimale pour l'obtention d'une toxine riche en valeur antigénique. Après ce temps, on filtre sur *bougie Chamberland* L 3; à ce sujet, on a intérêt à préparer plusieurs fioles à vide munies de bougies Chamberland; le tout est stérilisé au four Pasteur à 180°. On relie ensuite les fioles à des trompes à vide, ce qui permet de filtrer plusieurs échantillons en même temps. On obtient un liquide jaune limpide contenant la toxine staphylococcique. Si le filtrat reste trouble dans une fiole, nous le refiltrons sur *filtre Seitz*. Nous avons ainsi préparé les toxines de nos différentes souches staphylococciques, dont le pouvoir est comparé à des échantillons de toxines gracieusement mis à notre disposition par Richou. Le dosage de ces toxines a été fait par la méthode de précipitation suivant le principe indiqué par le *Codex pour l'anatoxine staphylococcique ;* nous y reviendrons à l'occasion de nos expériences personnelles.

En ce qui concerne les *hémolysines* α *et* β, nous voudrions tout d'abord insister sur le fait qu'il ne s'agit probablement pas de substances homogènes; en effet, certains auteurs ont prouvé que l'on peut différencier sérologiquement *diverses* α- *et* β-*hémolysines*. Nous n'insistons pas sur les autres hémolysines : δ, ε. D'après Elek et Levy (112), les trois *hémolysines* α, β *et* δ sont spécifiques et caractéristiques des *Staphylocoques coagulase-positifs*. Cependant, par un phénomène de mutation, l'une ou l'autre des hémolysines peut se perdre de sorte que l'on peut trouver pour une même souche des combinaisons toxiniques différentes. Ces auteurs ont examiné 200 Staphylocoques pathogènes pour l'homme et ont établi la statistique suivante : la combinaison $\alpha\,\delta$ = 82 %; $\alpha\,\beta\,\delta$ = 11 %; α seule = 3 %; δ seule = 4 %. En ce qui concerne les souches pathogènes pour les animaux, ils ont trouvé les combinaisons suivantes : $\alpha\,\beta\,\delta$ = 17 %; $\alpha\,\delta$ = 10 %; β = 7 %; $\alpha\,\beta$ = 5 %. Dans cette série, 2 % de souches étaient dépourvues d'hémolysines. De cette statistique, on pourrait conclure *qu'il est caractéristique pour les Staphylocoques pathogènes de l'homme d'être privé de* β-*hémolysines, tandis que les souches animales la possèdent presque toutes*. Cette spécificité de la β-hémolysine pour les souches d'origine animale est unanimement reconnue aujourd'hui.

Il faut cependant se rappeler que Christie et North *ont démontré qu'au moins* 85 % *des souches humaines possèdent la* β-*hémolysine ;* il existe par conséquent une controverse à ce sujet. Par contre, il semble prouvé que *l'*α-*hémolysine* existe toujours chez les souches coagulase-positives. D'autre part, la production d'α-hémolysine concorde avec la pathogénéité *des Staphylocoques* pour les souris.

Au point de vue caractères différentiels, il faut insister sur le fait que la β-hémolysine est détruite par un traitement au formol à 0,5 % sans que la toxine perde ses propriétés antigéniques; la β-hémolysine est thermostable à 60° pendant 15 minutes; elle est également élaborée en anaérobiose, contrairement aux autres hémolysines. Un autre caractère spécifique de cette β-hémolysine est son action lytique vis-à-vis des hématies de mouton. En boîte de Pétri à 37°, on assiste à une décoloration des hématies et la lyse définitive s'effectue seulement par exposition consécutive à 4°. Sur gélose au sérum, la β-hémolysine produit une opacité comparable à celle obtenue par la coagulase.

Les différentes hémolysines peuvent être caractérisées par leur action sur les hématies de mammifères : mouton, lapin, homme; on emploie plus rarement des hématies de cheval. Nous renvoyons au schéma de Marks et Vaughan (113) illustrant l'effet des hémolysines sur les milieux gélosés aux différents sangs.

D'après ces auteurs, l'emploi de la *gélose au sang de mouton* coulée en boîte de Pétri se prête le mieux à l'étude des propriétés des Staphylocoques. La *gélose au sang de lapin* est encore utilisable, tandis que le *milieu au sang humain* ne permet pas de diagnostiquer la pathogénéité des *souches à α-hémolysines*. Cet avis n'est cependant pas unanime, puisque différents facteurs peuvent influencer la réaction, parmi lesquels nous ne mentionnons que le taux de sang introduit dans le milieu de culture. Il existe également une controverse quant à l'avantage d'employer des plaques de gélose au sang plutôt que des techniques en tubes à hémolyse. Les auteurs français dans leur ensemble préfèrent ces dernières.

Dosage des toxines par la méthode de précipitation :

Nous avons utilisé différentes dilutions des toxines préparées comme indiqué antérieurement et d'un immunsérum préparé par Richou (114) par immunisation de chevaux et qui, conservé à l'état sec, renferme 250 U. par gramme de protéines. En effet, il est essentiel d'opérer avec des dilutions optimales qui permettront les meilleures conditions des réactions. C'est pour cette raison que nous avons employé la réaction de Dean et Webb, qui permet de déterminer utilement les zones correspondantes de dilution entre la toxine et le sérum. Par la suite, nous avons tenté d'utiliser ces deux réactifs aux dilutions les plus faibles possibles.

Les toxines ont été utilisées à 1/100 — 1/50 — 1/20 et 1/10, mais il s'est avéré qu'il faut l'employer à l'état pur si la quantité introduite dans la réaction est très petite. Nous avons dû modifier la méthode mise au point par Durrer; cet auteur affirme que le système optimal est atteint avec une dilution de 1/50^{e} d'immunsérum en présence d'une toxine pure ou diluée au 1/10^{e}. En effet, nos essais avec des dilutions d'immunsérum à 1/10 — 1/5 et 1/2 nous ont donné les meilleurs résultats.

Pour enregistrer numériquement les résultats, nous avons eu recours

à l'*électrophotomètre Lumetron*, en mesurant le degré de transmission. Les réactions étaient effectuées d'après le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° 6

Réactifs	Tube N°					
	1	2	3	4	5	6
Toxine pure	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4	0,0
Sérum au 1/2 200 U/cc.....	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Soluté physiologique	3,5	3,7	3,9	4,0	4,1	4,5

Nous donnerons ultérieurement les différentes valeurs enregistrées par rapport à la dilution d'immunsérum employée à 1/2.

Nous avons pu constater que la diminution d'intensité lumineuse est négligeable dans les premières heures pour les dilutions d'immunsérum de 1/50 et 1/5. Elle est assez faible ensuite jusqu'à la 6e heure. Par contre, avec l'immunsérum dilué à 1/2 l'opacification est sensible dès la première heure et augmente progressivement avec le temps. Avec les concentrations en toxines de 0,5 et 0,4 ml la réaction de précipitation reste en général négative. Ce fait montre que la dilution d'immunsérum au 1/2 est celle qui réalise le rapport optimal avec la plupart des toxines pures et à la dose de 0,8 et 0,5 ml. La dose de 0,6 ml semble être la plus favorable par rapport à la concentration de l'immunsérum à notre disposition.

Dosage des α-hémolysines par la méthode hémolytique :

Nous avons toujours procédé de la façon suivante : dans une série de tubes à hémolyse, on introduit la dose fixe d'immunsérum correspondant à la *dose-test hémolytique* ou à une fraction de celle-ci, et des quantités décroissantes des toxines à titrer. par exemple : 1 — 0,5 — 0,2 — 0,1 ml etc... Chaque tube préalablement amené à 2 ml à l'aide d'une solution tampon, est additionné d'une goutte d'hématies de lapin trois fois lavées et diluées au 1/3 qui servent de réactif spécifique. Après agitation, les tubes sont placés pendant une heure à 37° et laissés ensuite une heure à la température du laboratoire. On fait alors la lecture de l'hémolyse. La solution tampon utilisée était de composition :

NaCl	12,75 g
$Na^2HPO^4 + 12\ H^2O$	0,85 g
KH^2PO^4	0,20 g
Eau distillée q.s.p.	1500 ml

pH = 7,3

Nous donnons dans le tableau ci-dessous les résultats de l'un de nos essais, effectué avec une toxine dont la *dose-test hémolytique* est 0,23.

Cette dose hémolytique était déterminée au préalable au moyen de notre immunsérum-étalon.

Afin de mettre en évidence dans le sérum à titrer une quantité d'antitoxine inférieure à 1 unité nous avons mis dans chaque tube la quantité de toxine (0,023 ml) correspondant à 1/10e de la dose-test hémolytique.

TABLEAU N° 7

Titre correspondant	0,1 U.	0,2 U.	0,5 U.	1 U.
Toxine en ml	0,023	0,023	0,023	0,023
Sérum en ml	1,0	0,5	0,2	0,1
Hémolyse	—	—	++++	++++

Titre du sérum : + 0,2 à 0,5 unité

Pour obtenir une précision plus grande, il suffira de renouveler l'expérience en employant des quantités de sérum intermédiaires, par exemple 0,45 — 0,40 — 0,35 ml, etc...

Dosage des β-hémolysines par la méthode hémolytique :

Pour le dosage des *β-hémolysines*, nous avons eu recours à la même technique que précédemment, mais en remplaçant les hématies de lapin par des *globules de mouton* et en disposant les tubes après le séjour à 37°, à la glacière à 4° comme indiqué antérieurement.

Expériences proprement dites :

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats de ces essais, c'est-à-dire : dosage des toxines par la méthode de précipitation, dosage des hémolysines α, β et α + β.

En ce qui concerne les *toxines*, nous rapportons dans notre tableau les *degrés Lumetron* enregistrés au bout de 4 heures, pour 0,6 ml d'immunsérum au 1/2, qui constituent les valeurs optimales dans nos conditions expérimentales.

TABLEAU N° 8

Souche N°	Toxines	Hémolysines		
	Degrés Lumetron	α	β	α + β
1	30	+	—	—
2	24	+	—	—
3	45	+	—	—
4	43	+	—	—
5	30	+	—	—
6	15	+	+	+
7	90	—	+	—
8	25	+	—	—
9	88	+	+	—
10	28	+	—	—
11	32	+	+	+
12	76	—	+	—
13	27	+	—	—
14	66	—	+	—
15	22	+	+	+
16*	48	—	—	—
17*	81	—	—	—
18	16	+	+	+
19	39	+	+	+
20	18	+	—	—
21*	85	—	—	—
22	34	+	+	+
23	16	+	+	+
24	90	+	—	—
25	13	+	+	+
26	28	+	+	+
27	22	+	+	+
28	80	—	+	—
29	36	+	+	+
30	25	—	+	—
31*	37	—	—	—
32	36	+	—	—
33	47	+	—	—
34	40	+	+	+
35*	18	—	—	—
36	24	+	—	—
37*	42	—	—	—
38	46	—	+	—
39	25	+	—	—
40*	92	—	—	—
41	30	+	—	—
42	36	+	+	+

Souche N°	Toxines	Hémolysines		
	Degrés Lumetron	α	β	α + β
43*	78	—	—	—
44	29	+	+	+
45	31	+	—	—
46	19	+	+	+
47	35	—	+	—
48	22	+	—	—
49	37	+	+	+
50	33	+	+	+

En considérant ce tableau, on voit que parmi nos 50 souches pathogènes humaines, il y en a 80 % *fortement toxinogènes*, c'est-à-dire dont la production de précipité était telle qu'elle ne permettait plus qu'une transmission inférieure à 50° *Lumetron*. Ce nombre est inférieur à celui des *souches coagulase-positives* que nous avions trouvées antérieurement (92 %).

D'autre part, nous avons constaté que 34 % de nos souches sont *productrices d'α-hémolysines seules*, 16 % *de β-hémolysines seules*, 34 % *d'α + β-hémolysines*, tandis que 16 % de souches étaient *dépourvues des deux sortes d'hémolysines que nous avons caractérisées*. Il faut remarquer que parmi ces 8 souches (marquées par un astérisque dans le tableau), il y en a 4 qui sont toxinogènes, alors que les autres ne le sont pas, et ce fait pourrait être dû pour les premières, à la présence de *δ-hémolysines*, comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre.

Ces résultats concordent sensiblement avec ceux que l'on trouve dans la littérature spécialisée et montrent que le dosage *des précipitines et des hémolysines* ne peut pas servir, seul, au diagnostic de la pathogénéité des Staphylocoques. En particulier, nous attirons l'attention sur le fait que le pourcentage des α-hémolysines seules est relativement faible pour nos souches pathogènes humaines, et qu'en tout état de cause, il faut toujours prévoir la présence possible d'une combinaison de différentes hémolysines.

Les deux souches N° 9 et 35 méritent de retenir l'attention : toutes deux étant coagulase-négatives, il est curieux de constater que la souche N° 35 est *fortement toxinogène*.

En général, les souches *β-hémolytiques* ont un pouvoir toxinogène peu marqué, tout en étant coagulase-positives et d'origine humaine. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point ultérieurement.

CHAPITRE VII

RECHERCHE DU POUVOIR LIPASIQUE

Dans un travail sur les enzymes attaquant les lipides et pouvant se trouver dans les filtrats de culture *de Staphylocoques*, RICHOU et ses collaborateurs écrivent :

« *Multipliant les tests utilisés pour déterminer « in vitro » — sans certitude absolue d'ailleurs — le pouvoir pathogène des Staphylocoques, divers auteurs ont proposé de tenir compte, pour cette détermination, des résultats obtenus en ensemençant le Staphylocoque sur un milieu au jaune d'œuf (egg-yolk-réaction).* »

En 1952, GILLESPIE et ALDER ont été les premiers à signaler l'opacification d'un milieu de culture contenant du jaune d'œuf par certains Staphylocoques; l'enzyme responsable de cette action serait une *lipase* et non une *lécithinase*. Les auteurs ont utilisé ce test pour diviser *les Staphylocoques en deux groupes*. Un peu plus tard, ANDREONI a confirmé les observations des auteurs précités et conclut que *les Staphylocoques pathogènes* causent un trouble dans les milieux liquides et un halo d'éclaircissement sur les milieux solides, les uns et les autres étant additionnés de jaune d'œuf.

Cette découverte revient cependant à EIJKMAN qui, le premier en 1961, a pu démontrer la présence d'*enzymes lipolytiques* dans les filtrats de culture de *Staphylocoques*.

Contrairement aux résultats obtenus par GILLESPIE et ALDER, RICHOU et ses collaborateurs ont pu constater qu'il existe un rapport certain entre la coagulation du plasma oxalaté et la «*egg-yolk-reaction*». Ils confirment d'autre part les observations de ANDREONI, d'après lesquelles cette réaction est plus fréquemment positive pour les souches de *Staphylocoques* ayant des propriétés hémolytiques. Comme il existe également un certain parallélisme entre la coagulation du plasma oxalaté d'une part, la production d'uréase, de phosphatase et d'α-hémolysine d'autre part, nous avons jugé intéressant d'étudier *l'activité lipolytique de nos souches de Staphylocoques vis-à-vis de différents lipides*, tels que graisse neutre, ovolipides, lécithine, huile de maïs, tributyrine, ainsi que sur les différents Tweens.

A ce sujet, nous voudrions citer également l'école italienne, qui depuis 1939 s'intéresse à ce problème par les travaux de BRUNI, SCIO, FURNARI, PERNICE, pour n'en citer que quelques-uns.

Expériences personnelles :

Dans le *Service de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, KROEHNE (116), sur l'instigation de RICHOU, a examiné quelques toxines staphylococciques à l'aide d'une technique originale, mais qui malheureusement n'est pas à la portée générale des laboratoires cliniques, raison pour laquelle nous n'y avons pas eu recours.

Nous avons employé une *technique de diffusion en gélose*, utilisée par la plupart des auteurs qui nous ont précédé, méthode qui nous a donné satisfaction. L'intérêt pratique de cette technique ne saurait échapper, puisqu'elle peut être mise en œuvre pour étudier les propriétés enzymatiques des filtrats de culture d'un grand nombre de souches.

Le milieu de base est la *gélose de* MAC LUND modifiée par COLMER :

Peptone	10,0 g
Phosphate disodique	5,0 g
Phosphate monopotassique	1,0 g
Bromure de sodium	2,0 g
Sulfate de magnésie	0,1 g
Glucose	2,0 g
Gélose	25,0 g
Eau distillée	1000,0 ml

Nous avons supprimé dans ce milieu la peptone et le glucose, étant donné que nous n'avions pas besoin d'un substrat nutritif. Après dissolution on ajuste le pH à 7,4.

Les différents substrats lipidiques sont ensuite préparés de la façon suivante :

Gélose au jaune d'œuf :

On émulsionne un jaune d'œuf (environ 20 g) dans 17 ml de soluté physiologique. On prélève 10 ml de cette solution que l'on introduit dans 100 ml du milieu de base liquéfié et ramené à 55°.

Gélose à la graisse neutre, huile de maïs ou à la tributyrine :

On prépare une émulsion en introduisant 100 g de l'un ou l'autre de ces lipides dans une solution aqueuse contenant 2 g de *gomme adragante* pour 200 ml d'eau distillée chaude. Après agitation prolongée on obtient une émulsion que l'on stérilise pendant 15 minutes à 115°. On prépare d'autre part, comme indicateur-test, une *solution aqueuse de Bleu de Nil* à 1 %. On mélange ensuite :

Milieu de base	100 ml
Suspension lipidique	14 ml
Solution de Bleu de Nil	14 ml

Gélose à la lécithine :

On met en suspension 1 g de *lécithine pure* dans 10 ml d'eau distillée. Cette suspension est incorporée à 100 ml de milieu de base.

Gélose aux Tweens :

On prépare des solutions à 10 % de *Tween* 20, 40, 60 et 80, que l'on stérilise à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes. Au moment de l'emploi, on liquéfie 100 ml de milieu de base au chlorure de calcium de Pernice et Macri (117) et on y incorpore 10 ml de suspension de Tween et 14 ml de solution d'indicateur.

Les milieux ainsi préparés sont répartis à raison de 20 ml dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. On pratique ensuite des cupules de 8 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce. Les filtrats de culture toxiniques sont déposés sous un volume de 1/20e de ml dans ces cupules. Ces filtrats sont employés purs et à des dilutions de 1/3 — 1/10 — 1/30 — 1/50 et 1/100.

Les boîtes de Pétri sont placées pendant 24 heures à l'étuve à 42°. On procède à la première lecture des réactions qui, lorsqu'elles sont positives, se traduisent par un virage de l'indicateur coloré ou par un halo d'éclaircissement, ou encore par une zone de précipitation autour des cupules. On a intérêt à contrôler ces réactions encore pendant 2 jours consécutifs.

Il nous semble nécessaire de préciser, comme Richou et ses collaborateurs le mentionnent, que *les toxines staphylococciques* donnent par diffusion :

— *Dans la gélose au jaune d'œuf :* une zone d'éclaircissement avec parfois secondairement une zone de précipitation autour de la cupule, qui peut en s'étendant, masquer plus ou moins le premier phénomène.

— *Dans la gélose aux graisses, à l'huile de maïs et à la tributyrine :* une zone bleue intense, témoin de l'action lipasique, comme l'a montré Turner (118).

— *Dans la gélose à la lécithine :* une zone de précipitation plus ou moins marquée.

— *Dans la gélose aux Tweens :* une zone de précipitation cristalline due à la formation de savons de chaux, et qui forme un halo opaque très visible.

Pour définir le pouvoir lipolytique de ces filtrats staphylococciques, Richou propose le critère suivant :

« *Si, par exemple, une toxine diluée au* 1/10e *donne une réaction positive, alors que diluée au* 1/30e *elle ne donne plus de réaction, nous dirons qu'elle a une activité comprise entre* 10 *et* 30 *unités vis-à-vis de la substance lipidique incorporée à la gélose.* »

Pour plus de simplicité, nous donnons dans le tableau ci-dessous les résultats lus le troisième jour de l'expérience et exprimés en unités lipasiques selon la définition de Richou.

TABLEAU N° 9

Souche N°	Activité lipasique vis-à-vis de :								
	Jaune d'œuf	Graisse neutre	Trioléine	Tributyrine	Lécithine	Tweens			
						20 laurate	40 palmitate	60 stéarate	80 oléate
1	500	500	500	0	0	10	300	300	100
2	500	300	500	0	0	1	50	10	10
3	500	300	500	10	0	1	100	10	100
4	500	500	500	0	1	5	300	50	50
5	500	300	300	0	1	1	100	5	50
6	100	3	10	1	3	100	10	1	10
7	10	—1	0	10	10	100	1	1	5
8	300	300	500	3	0	0	100	10	100
9	30	—1	0	10	10	300	10	0	0
10	500	300	500	0	0	0	300	10	300
11	50	0	10	30	3	100	10	1	10
12	50	0	0	30	10	300	1	0	0
13	100	300	300	0	0	30	50	50	100
14	0	—1	0	10	3	300	1	0	0
15	50	0	10	30	1	50	10	0	10
16	500	300	500	0	0	30	100	10	100
17	10	0	10	50	10	100	0	0	10
18	30	0	30	3	3	300	10	3	30
19	100	10	50	3	3	50	5	0	30
20	500	500	500	0	0	1	300	10	100
21	50	—1	0	10	0	100	3	0	0
22	100	10	30	10	0	3	100	10	10
23	300	30	30	10	1	50	5	1	30
24	500	300	500	0	0	300	100	50	100
25	300	300	500	10	0	30	100	10	100
26	50	0	10	3	3	30	10	3	5
27	100	30	50	10	0	50	10	5	30
28	10	—1	0	30	0	100	0	0	10
29	300	300	300	10	0	100	100	3	50
30	30	0	0	10	1	300	3	1	0
31	500	500	500	0	0	0	100	10	50
32	500	500	500	1	0	1	300	30	100
33	300	300	300	3	0	3	100	10	100
34	50	30	50	3	3	100	30	0	3
35	500	300	300	0	0	10	300	50	100
36	500	300	500	0	0	0	100	50	300
37	300	500	500	0	0	0	300	100	300
38	10	0	0	30	0	300	10	0	0
39	500	300	500	1	0	1	100	100	300
40	30	1	10	30	0	50	3	0	10

Souche N°	Activité lipasique vis-à-vis de :								
	Jaune d'œuf	Graisse neutre	Trioléine	Tributyrine	Lécithine	Tweens			
						20 laurate	40 palmitate	60 stéarate	80 oléate
41	500	300	300	0	0	0	300	50	100
42	500	100	300	0	1	3	100	30	100
43	0	0	0	30	3	100	1	0	0
44	100	50	100	0	3	100	30	0	30
45	300	100	100	1	0	3	100	10	100
46	100	10	50	1	1	100	10	10	30
47	30	0	0	50	10	300	10	0	0
48	300	300	500	0	0	0	300	50	300
49	50	10	30	30	0	50	30	10	30
50	100	300	300	10	0	100	100	5	100

Interprétation:

En considérant ce tableau, on note tout d'abord que toutes les souches produisant de l'α-*hémolysine* possèdent un pouvoir lipolytique très prononcé sur les lipides à poids moléculaire élevé. En effet, elles dégradent le jaune d'œuf, les graisses neutres, la trioléine avec des valeurs se situant entre 300 et 500 *unités Richou*. En ce qui concerne les Tweens, elles attaquent surtout le palmitate et, avec moins de force, l'oléate. Leur activité lipasique est beaucoup moins prononcée vis-à-vis des stéarates et des laurates. Peu de ces souches présentent des taux d'activité sensiblement comparables sur l'ensemble des lipides étudiés. Un autre fait intéressant à noter est l'absence de lécithinase et d'estérase proprement dite.

Par contre, les *Staphylocoques* β-*hémolytiques* dégradent surtout la tributyrine, le Tween 20 et la lécithine. Il semblerait donc qu'il y aurait un *certain rapport entre la production des hémolysines et le pouvoir lipolytique*. La β-hémolysine semble freiner l'action des lipases proprement dites, ce qui ressort de nos résultats ayant trait aux *souches* α+β-*hémolytiques ;* celles-ci possèdent une activité lipasique moyenne ou faible sur le jaune d'œuf et les graisses neutres, mais sont un peu plus actives sur la tributyrine et la lécithine.

Les souches que nous soupçonnons être δ-*hémolytiques* et qui possèdent un taux de toxines élevé élaborent également les lipases les plus actives. Les quatre souches dépourvues de α, β et δ-hémolysines et à pouvoir toxinogène faible élaborent surtout des estérases et des lipases agissant sur le Tween 20.

Dans l'ensemble, nous notons que parmi nos 50 souches, près de la moitié sécrètent des estérases ou des lécithinases; dans ce cas, il s'agit toujours de germes peu toxinogènes.

Ces résultats illustrent la complexité de l'activité lipolytique des toxines staphylococciques et nous autorisent à conclure que l'enzyme présent dans ces filtrats, actif sur les lipides à poids moléculaire élevé, est essentiellement une lipase. Les toxines ne possédant qu'un faible pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges de lapin n'exercent guère d'action sur les graisses neutres, mais agissent simultanément sur la lécithine et la tributyrine.

Ces expériences, qui confirment les travaux de Richou et de l'école italienne, laissent supposer que les toxines produites par des souches de *Staphylocoques d'origine humaine et douées d'un pouvoir α-hémolytique élevé, renferment une lipase*, alors qu'elles contiennent une lécithinase et une estérase lorsque leur pouvoir α-hémolytique est faible et leur toxicité imputable à la β-hémolysine. L'examen du pouvoir lipolytique mériterait donc d'être adjoint aux autres réactions de diagnostic différentiel de la pathogénéité des Staphylocoques.

Pour permettre une étude comparative de ces différents tests, nous allons les rapporter dans un tableau récapitulatif général.

TABLEAU N° 10

Souche N°	Coagulase	Lyse après 24 h	Fibrinolysine	Plasma agglutination	Toxines degrés Lumetron	Hémolysines				Lipases sur jaune d'œuf
						α	β	α + β	(*) (néant)	
1	+	—	+	+	30	+	—	—		+
2	+	—	+	+	24	+	—	—		+
3	+	—	+	+	45	+	—	—		+
4	+	—	+	+	43	+	—	—		+
5	+	—	+	+	30	+	—	—		+
6	+	±	+	+	15	+	+	+		±
7	+	+	—	+	90	—	+	—		—
8	+	—	+	+	25	+	—	—		+
9	—	—	—	—	88	—	+	—		—
10	+	—	+	+	28	+	—	—		+
11	+	±	+	+	32	+	+	+		—
12	±	+	—	—	76	—	+	—		—
13	+	—	+	+	27	—	—	—		±
14	+	+	—	+	66	—	+	—		—
15	+	+	+	+	22	+	+	+		—
16	+	±	±	+	48	—	—	—	+	+
17	+	+	±	+	81	—	—	—	+	—
18	+	+	+	—	16	—	+	+		—
19	+	+	+	+	39	+	+	+		±
20	+	—	+	+	18	+	—	—		+

Souche N°	Coagulase	Lyse après 24 h	Fybrinolysine	Plasma agglutination	Toxines degrés Lumetron	Hémolysines				Lipases sur jaune d'œuf
						α	β	α + β	(*) (néant)	
21	±	+	±	+	85	—	—	—	+	—
22	+	+	+	+	34	+	+	+		±
23	+	+	+	+	16	+	+	+		+
24	+	—	+	+	90	+	—	—		+
25	+	±	+	+	13	+	+	+		+
26	+	+	+	+	28	+	+	+		—
27	+	±	+	+	22	+	+	+		±
28	+	+	—	+	80	—	+	—		—
29	+	±	+	+	36	+	+	+		±
30	+	+	—	+	25	—	+	—		—
31	+	+	±	+	37	—	—	—	+	+
32	+	—	+	+	36	+	—	—		+
33	+	—	+	+	47	+	—	—		+
34	+	+	+	+	40	+	+	+		—
35	—	—	±	—	18	—	—	—	+	+
36	+	—	+	+	24	+	—	—		+
37	+	+	±	+	42	—	—	—	+	+
38	+	+	—	+	46	—	+	—		—
39	+	—	+	+	25	+	—	—		+
40	+	+	±	+	92	—	—	—	+	—
41	+	—	+	+	30	+	—	—		+
42	+	±	+	+	36	+	+	+		+
43	±	+	±	+	78	—	—	—	+	—
44	+	±	+	+	29	+	+	+		±
45	+	—	+	+	31	+	—	—		+
46	+	+	+	+	19	+	+	+		±
47	+	+	—	+	35	—	+	—		—
48	+	—	+	+	22	+	—	—		+
49	+	+	+	+	37	+	+	+		—
50	+	+	+	+	33	+	+	+		±

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En nous basant sur *leur pouvoir coagulant et hémolytique*, nous avons sélectionné 50 souches de *Staphylocoques isolés de foyers infectieux humains* dans le but de contrôler « *in vitro* » les techniques utilisées actuellement pour le diagnostic de cette pathogénéité pour l'homme.

A ce sujet, nous avons jugé nécessaire de consacrer un chapitre de notre *Historique* à la classification et à l'identification des *Staphylocoques pathogènes.*

Le *Chapitre II* a été réservé aux *considérations épidémiologiques* sur les principales affections staphylococciques et principalement à l'« *hospitalisme staphylococcique* ». On connaît en effet l'importance de cette question, renforcée encore de nos jours par l'emploi massif de l'antibiothérapie dans les cliniques. Les énormes progrès faits en ces dernières années en sérologie et en lysotypie, ont permis de classer, comme nous l'avons montré, l'éspèce *Staphylococcus pyogenes aureus* dans de nombreux types et variétés. Ces techniques sont cependant assez compliquées et restent réservées à des laboratoires spécialisés, de sorte qu'il nous a semblé souhaitable de pouvoir sélectionner de prime abord ces souches par des méthodes plus simples et mieux adaptées à la pratique courante, afin d'éliminer d'emblée celles qui ne sont pas directement en relation avec une épidémie ou une endémie hospitalière.

Nous avons donc tenu à étudier les *propriétés biochimiques et enzymatiques des Staphylocoques* en rapport avec leur pathogénéité, et à examiner leur valeur comme test de cette dernière.

Pour étayer nos recherches, nous avons tenu à rapporter au début de chaque chapitre les données les plus récentes de la littérature spécialisée en ce qui concerne le problème étudié.

Nos *travaux personnels* font l'objet de cinq chapitres, dont le premier a trait au *diagnostic différentiel des Staphylocoques pathogènes par la réaction de coagulase*, considérée comme test essentiel de la pathogénéité de ces germes pour l'homme. Cette réaction a été contrôlée après 1 — 2 — 4 et 24 heures et nous y avons tenu compte de la vitesse de lyse du coagulum durant ce laps de temps.

Sur les 50 souches examinées, nous en avons trouvées 92 % à *coagulase positive.* Parmi ces souches, 66 % lysent le coagulum dans les premières 24 heures.

Dans le chapitre suivant, nous avons contrôlé la *production de fibrinolysine*, en employant le milieu spécifique de CHAPMAN au plasma de

lapin chauffé à 60° pendant 5 minutes pour précipiter quantitativement le plasma gélosé. Nous avons ainsi constaté que 68 % de nos souches pathogènes possédaient un pouvoir fibrinolytique franchement positif, 16 % donnaient une fibrinolyse douteuse et 16 % étaient dépourvues de fibrinolysines. On voit ainsi l'importance de l'emploi simultané de ces deux tests pour la mise en évidence de *la pathogénéité des Staphylocoques*. Nous remarquons cependant que la fibrinolysine donne des réactions un peu inférieures à celles de la coagulase (84 % et 92 %).

Le *test de la fibrinolysine* a donc une certaine importance, puisqu'un résultat positif indique indubitablement *la pathogénéité du germe pour l'homme ;* par contre, un résultat négatif ne permet pas de conclure que le germe examiné est saprophyte. Mentionnons tout de suite que *les souches β-hémolytiques ne contiennent jamais de fibrinolysine*, comme nos expériences ultérieures le démontreront.

Nous avons ensuite tenu à mettre à l'épreuve la technique de *plasma-agglutination*, méthode plus récente et qui n'a été que peu contrôlée quant à la mise en évidence de la pathogénéité des germes. Il s'agit d'une microméthode, permettant la lecture des résultats entre 30 et 60 secondes. Elle nous a permis de déceler parmi nos souches 94 % de plasma-agglutinations positives. *Il faut retenir qu'une plasma-agglutination positive est assez rare chez des Staphylocoques coagulase-négatifs*. En effet, nous avons examiné 50 souches de Staphylocoques saprophytes avec les résultats suivants : *plasma-agglutination positive :* 0 % ; *douteuse :* 18 % ; *négative :* 82 % Pour toutes ces souches, la réaction de coagulase s'est avérée négative.

En considérant ces résultats, *on peut conclure que la plasma-agglutination est plus sensible encore que la réaction de coagulase* pour mettre en évidence la pathogénéité des Staphylocoques. Nous pensons que cette plus grande sensibilité est due au fait que la fibrinolysine n'a pas le temps d'entrer en action étant donné la très courte durée de la réaction de plasma-agglutination, contrairement à ce qui se passe dans la réaction de coagulase. On voit cependant que cette dernière est plus spécifique, puisqu'elle est négative à 100 %, alors que la plasma-agglutination nous a donné des résultats douteux dans 18 % des cas. Il n'en reste pas moins que cette réaction peut rendre des services appréciables dans la pratique clinique.

Nous avons ensuite essayé de caractériser nos souches de *Staphylocoques pathogènes* d'après leurs *toxines* décelables sérologiquement. A ce sujet, nous avons recherché les *précipitines* au moyen d'un immunsérum antitoxique, puis les *hémolyses α et β*. Pour obtenir des filtrats toxiniques, nous avons employé la méthode de Richou au moyen du milieu R.A.P. *Les précipitines* ont été mises en évidence par la *réaction de Dean et Webb* en utilisant l'immunsérum dilué à 1/2 et à dose constante et les filtrats toxiniques à des doses progressivement décroissantes.

Le *dosage des α-hémolysines* a été effectué par la méthode classique au

moyen d'hématies de lapin et celui des β-*hémolysines* en présence d'hématies de mouton et en poursuivant la lecture après un séjour à + 4°.

Nous avons ainsi pu constater que parmi nos souches pathogènes pour l'homme, il y en avait 80 % fortement toxinogènes, c'est-à-dire dont *le trouble de précipitation* était tel qu'il ne permettait plus qu'une transmission inférieure à 50° *Lumetron*. Le pourcentage de souches *précipitines-positives* était donc inférieur à celui des souches coagulase-positives.

D'autre part, nous avons constaté que 34 % de nos germes sont producteurs d'α-*hémolysines seules*, 16 % de β-*hémolysines seules*, 34 % d'α+β-*hémolysines*, tandis que 16 % des souches étaient dépourvues des deux sortes d'hémolysines que nous avons caractérisées; parmi celles-ci, un certain nombre était fortement toxinogène et nous supposons qu'il s'agit là de souches produisant la δ-*hémolysine seule*.

Ces essais nous permettent de conclure que la recherche de ces facteurs ne permet pas, seule, le diagnostic de la pathogénéité des Staphylocoques pour l'homme et en tout état de cause, il faut toujours prévoir la présence possible d'une combinaison de différentes hémolysines. Il ne semble de toutes façons pas exister de rapport entre la toxinogenèse d'un côté et la positivité de la réaction de coagulase de l'autre côté, *puisqu'un certain nombre de nos souches* (par exemple les N° 12 — 14 — 17 — 24, etc.) *sont productrices très actives de coagulase alors que la toxinogenèse est insignifiante*. D'autre part, les germes dépourvus *de fibrinolysine* et munis *d'un pouvoir coagulant* très prononcé, paraissent beaucoup plus toxiques et élaborent des précipitines très actives. *L'absence de fibrinolysine semble donc favorable à la toxinogenèse*. La discordance entre le taux de coagulase et celui de précipitines ressort aussi des cas N° 9 et 35, qui sont coagulase-négatifs mais la souche N° 35 est néanmoins très toxinogène. Dans ce cas, il faudrait considérer la possibilité d'une infection mixte due à un mélange de souches humaines et animales. *Ce fait plaide en faveur de la recherche des différentes hémolysines*.

Dans ces derniers temps, on a multiplié les tests devant permettre de déterminer « *in vitro* » *le pouvoir pathogène des Staphylocoques* sans pouvoir obtenir une concordance absolue des résultats ; c'est pourquoi nous avons jugé intéressant de mettre en évidence *le pouvoir lipolytique de nos souches*. A ce sujet, nous avons employé différentes substances comme substrat lipidique et tenté d'adapter notre technique aux besoins de la clinique. C'est ainsi que nous avons eu recours au jaune d'œuf, à la graisse neutre, à l'huile de maïs, à la trioléine, à la tributyrine, à la lécithine et aux Tweens 20, 40, 60 et 80.

Toutes les souches produisant une α-hémolysine active semblent posséder un pouvoir lipolytique très prononcé sur les lipides à poids moléculaire élevé. Parmi les Tweens, elles attaquent surtout le palmitate et d'une façon moindre, l'oléate.

Peu de nos souches ont présenté des taux d'activité comparables sur l'ensemble des lipides étudiés. Par contre, *les Staphylocoques β-hémolytiques dégradent surtout la tributyrine, le Tween 20 et la lécithine*. Il semble

donc exister un certain rapport entre la production d'hémolysines et le pouvoir lipolytique. Les β-*hémolysines* semblent freiner l'action des lipases proprement dites, comme elles freinent également la fibrinolyse. Les souches dépourvues de α, β et δ-*hémolysines* et à pouvoir toxinogène faible élaborent surtout des *estérases* qui dégradent les esters d'acides gras à poids moléculaire faible (*de l'acide propionique à l'acide laurique*).

On voit ainsi que *les Staphylocoques pathogènes d'origine humaine* sont doués de propriétés lipasiques pouvant s'exercer vis-à-vis des ovolipides, des graisses et huiles neutres ; par contre, les toxines ne possédant qu'un très faible pouvoir hémolytique vis-à-vis des hématies de lapin n'exercent guère d'action sur ces lipides supérieurs, mais agissent surtout sur la lécithine et les esters d'acides gras inférieurs ; elles peuvent accessoirement avoir une faible action sur le jaune d'œuf.

Nous avons pu constater que la toxine des Staphylocoques pathogènes peut être très complexe et que ses propriétés sont multiples et variables. Il est vraisemblable que ces divers facteurs toxiniques et enzymatiques jouent un rôle non négligeable dans la pathogénéité des différentes Staphylococcies humaines et animales.

Pour terminer, nous ne pouvons mieux faire que de souscrire à l'opinion de Richou, qui dit :

« *Il nous semble nécessaire, lorsqu'on désire déterminer « in vitro » le pouvoir pathogène d'un Staphylocoque, d'utiliser simultanément plusieurs tests : coagulase sur du plasma oxalaté, recherche des hémolysines, des précipitines et agglutinines, recherche des propriétés lipolytiques, et de n'attacher à la fermentation du mannitol qu'un intérêt pour la sélection préliminaire de ces germes.* »

BIBLIOGRAPHIE

(45) Allison W.D. — Proc. Roy. Soc. Med., 1949, 42, 216.

(96) Aoi et Kitsato — Arch. Exp. Méd., 1932, 9, 171.

(29) Barrow G.I. — Journ. Hyg., 1955, 53, 495.

(71) Bekker J.H. — Antonie van Lœwenhœck Journ. Microbiol. and Serol., 1947, 13, 128.

(109) Bergey — Journ. Path. and. Bact., 1943, 55, 435.

(107) Birch-Hirschfeld — Klin. Wochenschrift, 1934, 13, 331.

(92) Boake W.C. — Journ. of Immunol., 1956, 176, 89.

(111) Boivin et Richou — C.R. Soc. Biol., 1936, 139, 547.

(28) Browne, Ryan, Glassow, Martin et Shouldice — Journ. Amer. Med. Ass., 1959, 170, 1274.

(65) Bruschettini C. — Ann. Igiene, 1949, 52, 249.

(108) Cadness-Graves et Williams — Lancet, 1943, 244, 736.

(43) Cathcart, Godkin et Barnett — Food Res., 1947, 12, 142.

(64) Chapman — Journ. Path., 1937, 33, 533 ; 1938, 35, 111.

(16) Chapman et Berens — Journ. Bact., 1935, 29, 437.

(13) Christie et Keagh — Journ. Path. Bact., 1940, 51, 189.

(63) Christie et Keagh — Journ. Path. Bact., 1940, 51, 193.

(103) Christie et Wilson — Austr. Journ. exp. Biol., 1941, 19, 329.

(70) Clapper et Wood — Journ. Bact., 1954, 67, 545.

(23) Colbeck J.C. — Amer. Journ. Publ. Health (Albany), 1960, 50, 468-473.

(36) Cook, Elliott et Elliott-Smith — Brit. Med. Journ., 1957, 1, 542.

(58) Delezenne — Arch. Physiol. Norm. et Path., 1898, 19, 508 et 568.

(30) Devenish et Miles — Lancet 1939, 1, 1088.

(11) Dudgeon L.S. — Journ. Path. Bact., 1947, 12, 212.

(115) Durrer P. — *Influence de l'acide pantothénique sur le complément et les anticorps*

spécifiques. A propos de la vaccination diphtérique, tétanique et T.A.B. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1959.

(74) Duthie E.S. — Journ. gén. Microbiol., 1952, 7, 320.

(86) Duthie E.S. — Journ. gén. Microbiol., 1952, 7, 325.

(105) Eckner L. — *Recherches sur les antigènes staphylococciques.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960.

(27) Edmunds, Elias-Jones, Forfas et Balf — Brit. Med. Journ.. 1955. 1. 990.

(93) Ekstedt et Nungester — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89, 90.

(112) Elek et Levy — Journ. Path. and Bact., 1954, 68, 31.

(17) Epstein — Arch. Derm. and Syph., Wien, 1934, 170, 586.

(32) Foster et Hutt — Lancet, 1960, 2, 1373.

(104) Frey W. — *Streptokinase et Antistreptokinase. Étude expérimentale et immunologique.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1959.

(76) Fusillo et Jaffurs — Journ. Bact., 1955, 70, 481.

(95) Gengou — Ann. Institut Pasteur, 1933, 51, 14.

(88) Gerheim, Ferguson et Travis — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.. 1947. 66, 525.

(67) Gonzenbach W. et Uemura H. — Zentralblatt Bakt.. Orig.. 1916. 78, 97.

(9) Gordon M. — Report of Med. Office Local Covern Board, 1905, B 543.

(57) Gould J.C. — Lancet, 1958, 1, 489.

(94) Gratia — Arch. Intern. Physiol., 1921, 18, 355.

(61) Gross H. — Klin. Wochenschr., 1927, 6, 2281.

(69) Gross — Klin. Wochenschr., 1933, 12/1, 340.

(1) Grün L. — *Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen.* Westdeutscher Verlag. Köln, 1951.

(110) Guillaume F. — *Les anticorps précipitants dans les staphylococcies expérimentales. Leurs rapports avec la pantothénothérapie.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1962.

(80) Haliman F.A. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1937, 36, 789.

(39) Hassal et Rountrée — Lancet, 1959, 1, 213.

(83) Jacherts D. — Zeitsch. Hygiene, 1956, 142, 502.

(6) Jackson, Gibbons et Magner — Amer. Journ. Path., 1958, 34, 1051.

(72) Kaplan et Spink — Blood, 1948, 3, 573.

(62) Kemkes — Zentralblatt Bakt., 1928, 109, II.

(21) Kesselring Ch. — *Étude des propriétés des toxines staphylococciques par immuno-électrophorèse. Leur rapport avec la pantothénothérapie.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1963.

(5) Kienitz et Preuner — Zentralblatt Bakt., Abt. I Orig., 1958, 173, 203-212.

(2) Kikuth W. et Grün L. — Deutsche Med. Wochenschr., 1957, 82, 549.

(56) Kikuth W. et Grün L. — Deutsche Med. Wochenschr., 1957, 82, 551.

(18) Klastrup — Nord. Vet. Med., 1955, 7.315.

(82) Kosunen et Parmala — Amer. Med. Exp. and Biol., Fenniae, 1956, 34, 150.

(8) Kourilsky et Mercier — Revue Immunologie, 1940, 6, 19.

(102) Kourilsky et Mercier — Ann. Biol. Clinique, 1949, 506, 173.

(47) Krassickaja E.S. — Dermat. Wochenschrift, 1950, 121, 61.

(54) Krepler P. — Wiener Klin. Wochenschrift, 1957, 69, 943.

(20) Kretschmar et Witt — Zeitschrift ges. Hygiene, 1960, 6, 393.

(116) Kroehne O.G. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactéries. Leurs caractères différentiels par rapport aux lipases pancréatiques et fongiques.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(101) Lack C.H. — Nature, 1948, 161, 559.

(75) Lack et Walling — Journ. Path. and. Bact., 1954, 68, 431.

(90) Lieb F. et Nothhacksberger W. — Arch. Hygiene, 1944, 131, 31.

(59) Loeb L. — Journ. Med. Res., 1903, 10, 407.

(66) Lominski J. et Roberts G.B. — Journ. Path. and Bact., 1946, 58, 187.

(31) Lund F. — Acta Chir. Scand., 1957, 114, 419.

(48) Mac Dermott W. — Ann. N.Y. Acad. Science, 1956, 65, 58.

(97) Madison — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1934, 32, 445; 1935, 33, 209.

(113) Marks et Vaughan — Journ. Path. and Bact., 1950, 62, 597.

(52) Matejowska et Raska — Zentralblatt Bakt., Abt. 1, Orig., 1961, 182, 41.

(73) Mercier, Pillet et Péry — Ann. Institut Pasteur, 1948, 74, 148.

(15) Meyer W. — Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, 1962, Heft 15, p. 25.

(34) Meyer W. et Rische H. — Zentralblatt Bakt., Abt. 1 Orig., 1960, 178, 156.

(51) Milch H. — Acta Microbiol. Acad. Science Hung., 1960, 7, 419.

(84) Moese et Laurentschitsch — Arch. Hyg., 1950, 132, 123.

(44) Mossel D.A. — Wiener tierärztl. Wochenschrift, 1956, 43, 321.

(60) Much H. — Biochem. Zeit., 1908, 14, 143.

(98) Netter E. — Journ. of Bact., 1937, 34, 243.

(81) Oker-blom N. — Acta path. Scand., 1955, suppl., 111, 142.

(68) Otte H.J. et Walter O. — Zbl. Bakt., Orig., 1955, 164, 601.

(12) Pakula, Rabsynska et Zaleska — Med. Doswiadz. i mikrobiol., (Warszawa) 1953, 5, 71.

(77) Penfold J.B. — Journ. Path. and Bact., 1944, 56, 247.

(117) Pernice et Macri — Giorn. Batt. Virol. e Immunol., 1960, 11-12, 449.

(99) Pillet, Mercier et Péry — Ann. Institut Pasteur, 1948, 75, 458.

(106) Pillet, Orta et coll. — Ann. Institut Pasteur, 1954, 86, 752.

(49) Poehn H. — Tagungsbericht, Zentrallabor. für Lysotypie, Wernigerode, 1957, 95, 98.

(85) Rammelkamp et coll. — Journ. exp. Med., 1950, 91, 295.

(7) Ramon G. et Richou R. — Revue Immunologie, 1950, 14, 161.

(78) Reid et Jackson — Journ. Labor. Clin. Med., 1945, 30, 155.

(14) Richou R. — Revue Path. générale et comparée, 1953, 645, 178.

(114) Richou, Nelis et Bonnet — Revue Immunologie, 1935, page 402; Presse Médicale, 1935, N° 57.

(24) Roodyn L. — Brit. Med. Journ., 1954, 2, 1322.

(100) Rountree P.M. — Austr. Journ. exp. Biol. and Med., 1947, 25, 359.

(26) Ruys, Beeuwkes, Koopmans et Mulder — Tropic Geograph. Med., 1958, 10 142.

(55) Schmidt J. — Zentralbl. Bakt., Abt. 1, Orig., 1961, 181, 359.

(50) Schmidt et Lenk — Zentralbl. Bakt., Abt. 1, Orig., 1958, 171, 590,

(38) Senn et Lundsgaard-Hansen — Helvet. Med. Acta, 1956, 23, 1-47.

(3) Shaw, Stitt et Cowan — Journ. gen. Microbiol., 1951, 4, 1010-23.

(4) Smith, Beals, Kingsbury et Hasenclever — Arch. Int. Med. Chicago, 1958, 102, 375.

(87) Smith H.W. et Hale J.H. — Brit. Journ. exp. Path., 1947, 28, 57.

(91) Smith et Johnston — Nature, 1956, 178, 982.

(42) Stolmakowa — Vopr. Pit. (Moscou), 1954, 5, 7, 28.

(89) Tager M. — Yale Journ. Biol. and Med., 1948, 20, 369.

(41) Takaes et Juhasz — Elelmezesi ipar., 1957, 3, 4.

(19) Tulinius et Rosendal — Acta Path. Microbiol, Scand., 1955, suppl. III, 140.

(118) Turner — Journ. Inf. Dis., 1929, 44, 126.

(25) Valentine F.C.O. et Hall-Smith S.P. — Lancet, 1952, 2, 351.

(40) Walker et Hamburger — Journ. Lab. Clin. Med., 1959, 53, 931.

(37) Webster C.W. — Lancet, 1958, 2, 1036.

(22) Williams R.C.O. — Lancet, 1959, 1, 190.

(53) Williams et Jevons — Zentralblatt Bakt., Abt. 1, Orig., 1961, 181, 349.

(35) Williams et Rippon — Journ. Hyg., 1952, 50, 320.

(10) Winslow C.E.A. — Journ. Bact., 1920, 5, 145.

(79) Woods et Parkin — Austr. Journ. Exp. Biol. and Med. Sci., 1946, 24, 33.

(46) Worseck M. — Arch. Lebensmittelhygiene, 1956, 164, 1733.

(33) Wysham et Kirby — Journ. Amer. Med. Assoc., 1957, 164, 1733.

Vu, Strasbourg, le 17 février 1964

Le Président du Jury,

R. SARTORY.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 3 mars 1964

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

G. GAZET DU CHATELIER.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 5 mars 1964

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université,

J. F. ANGELLOZ.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 9

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Classification et identification des Staphylocoques pathogènes

Évaluation du pouvoir pathogène des Staphylocoques 13

CHAPITRE II

Considérations épidémiologiques sur les principales affections staphylococciques

Les dermatoses 17
Infections localisées à certains organes 19
Affections staphylococciques généralisées 20
Affections dues aux toxines staphylococciques 20
L'hospitalisme staphylococcique 22

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

Diagnostic différentiel des Staphylocoques et de leur pathogénéité par la réaction de coagulase

Expériences proprement dites 31

CHAPITRE IV

Le processus de Fibrinolyse

Expériences proprement dites 39

CHAPITRE V

La réaction de plasma-agglutination

Expériences proprement dites 46

CHAPITRE VI

Toxines et hémolysines

Dosage des toxines par la méthode de précipitation 51
Dosage des α-hémolysines par la méthode hémolytique 52
Dosage des β-hémolysines par la méthode hémolytique 53

CHAPITRE VII

Recherche du pouvoir lipasique

Expériences personnelles 58

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 65

BIBLIOGRAPHIE 69

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

✳

Dépôt légal N° 4076/1964